P 260

MÉMOIRES
DU
MUSÉUM NATIONAL
D'HISTOIRE NATURELLE

Série D, Sciences physico-chimiques

TOME III

FASCICULE 1

Claude ROPARS
Ingénieur E.N.S.C.T.

ÉTUDE, PAR RÉSONANCE PARAMAGNÉTIQUE ÉLECTRONIQUE ET PAR POTENTIOMÉTRIE, DE LA FIXATION DES IONS CUIVRIQUE ET FERRIQUE SUR L'ACIDE DÉSOXYRIBONUCLÉIQUE ET QUELQUES UNS DE SES DÉRIVÉS

PARIS
ÉDITIONS DU MUSÉUM
38, rue Geoffroy-Saint-Hilaire (V^e^)

1966

MUSEUM D'HISTOIRE NATURELLE

12 280-1

MÉMOIRES

DU

MUSÉUM NATIONAL

D'HISTOIRE NATURELLE

NOUVELLE SÉRIE

Série D, Sciences physico-chimiques

TOME III

FASCICULE I

PARIS
ÉDITIONS DU MUSÉUM
36, rue Geoffroy-Saint-Hilaire (V^e^)

1966

Source : MNHN, Paris

Source : MNHN, Paris

MÉMOIRES DU MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE
Série D, tome III, fasc. 1.

ÉTUDE, PAR RÉSONANCE PARAMAGNÉTIQUE ÉLECTRONIQUE ET PAR POTENTIOMÉTRIE, DE LA FIXATION DES IONS CUIVRIQUE ET FERRIQUE SUR L'ACIDE DÉSOXYRIBONUCLÉIQUE ET QUELQUES UNS DE SES DÉRIVÉS

par

C. ROPARS
Ingénieur E.N.S.C.T.

SOMMAIRE

CHAPITRE PREMIER INTRODUCTION pages

I. — Rappels sur la structure de l'ADN 1

II. — Rôle des ions métalliques 4

III. — Plan de travail 6

CHAPITRE II. MÉTHODES DE MESURE ET PRINCIPES DES CALCULS UTILISÉS

I. — La résonance paramagnétique électronique 8

II. — Application d'une propriété physique linéairement additive à l'étude des complexes métalliques 19

III. — Mesures potentiométriques appliquées aux complexes de l'ion ferrique 25

Source : MNHN, Paris

Chapitre III. COMPLEXATION DE L'ION CUIVRIQUE

I. — Introduction 34

II. — Résultats expérimentaux. 38

III. — Discussion 53

Chapitre IV. COMPLEXATION DE L'ION FERRIQUE

I. — Étude potentiométrique en milieu acide 59

II. — Étude par résonance paramagnétique électronique. . . . 68

III. — Discussion 72

Chapitre V. CONCLUSIONS-PERSPECTIVES 76

ANNEXE 78

BIBLIOGRAPHIE 81

Source : MNHN, Paris

CHAPITRE PREMIER

INTRODUCTION

Il devient superflu, actuellement, d'insister sur l'importance du rôle biologique des acides nucléiques, supports de l'hérédité et fondements des mécanismes qui prennent naissance dans la cellule vivante; par contre, il nous faut souligner la présence constante, dans ces composés, d'ions métalliques et la place prépondérante qu'ils y occupent.

Nous rappellerons, tout d'abord, quelques données essentielles sur la structure de l'acide désoxyribonucléique, puis nous préciserons le rôle des ions métalliques. Ainsi, nous serons amenés à exposer les raisons de notre travail et à justifier les méthodes que nous avons utilisées.

I. — RAPPELS SUR LA STRUCTURE DE L'ADN

Il existe deux types d'acides nucléiques :

— l'acide désoxyribonucléique ou ADN, localisé dans le noyau de la cellule,

— les acides ribonucléiques ou ARN, aux fonctions cellulaires multiples, chargés de transmettre au reste de la cellule les informations biologiques reçues au niveau de l'ADN.

Nous nous limiterons au rappel des données structurales de l'ADN, nécessaires à la compréhension des chapitres suivants.

L'acide désoxyribonucléique est constitué :

— d'une chaîne macromoléculaire provenant de la condensation d'un sucre, le désoxyribose (fig. 1), avec l'acide orthophosphorique,

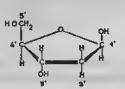


FIG. 1. — Désoxyribose.

— chaque sucre est lié à une molécule organique : la base azotée.

Source : MNHN, Paris

1.1 **Les bases.**

Les bases sont de deux types :

1.1.1 *Les bases pyrimidiques* (fig. 2).

Elles dérivent toutes d'un composé initial, la pyrimidine. Les deux principales bases pyrimidiques présentes dans l'ADN sont la cytosine et la thymine. Cette dernière est remplacée par l'uracile dans l'ARN.

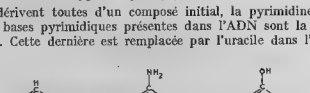


FIG. 2. — Bases pyrimidiques.

1.1.2 *Les bases puriques* (fig. 3).

Ce sont des dérivés d'un composé initial, la purine, qui provient de la fusion d'un cycle pyrimidique et d'un cycle imidazole.

Les deux principales bases puriques, communes à l'ADN et l'ARN, sont la guanine et l'adénine.

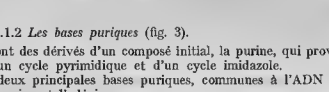


FIG. 3. — Bases puriques.

Il existe en moindre proportion dans les acides nucléiques un certain nombre d'autres bases, puriques ou pyrimidiques, dont nous ne développerons pas ici les caractéristiques.

1.2 **Les nucléosides.**

Chacune des bases précédentes se condense, dans le cas de l'ADN, avec le désoxyribose pour former un désoxyribonucléoside. Ce sont :

adénine + sucre → désoxyadénosine
guanine + sucre → désoxyguanosine
cytosine + sucre → désoxycytidine
thymine + sucre → thymidine

Source : MNHN, Paris

La condensation se fait entre l'hydroxyle en 1′ du sucre et respectivement l'azote 3 pour les bases pyrimidiques et l'azote 9 pour les bases puriques.

1.3 Les nucléotides.

Les nucléotides sont les esters phosphoriques des nucléosides. On rencontre un certain nombre d'isomères, selon que la condensation sucre-phosphate se fait sur l'un ou l'autre des hydroxyles du sucre. Nous ne considérerons que les esters monophosphoriques résultant de la fixation d'un groupement phosphate sur l'hydroxyle en 5′ du sucre.

Les différents produits obtenus portent les noms :

— désoxyadénosine – 5′ – monophosphate (acide désoxyadénylique) : d AMP
— désoxyguanosine – 5′ – monophosphate (acide désoxyguanylique) : d GMP
— désoxycytidine – 5′ – monophosphate (acide désoxycytidylique) : d CMP
— thymidine – 5′ – monophosphate (acide thymidylique) : TMP

1.4 La molécule d'ADN.

1.4.1 *Structure primaire.*

La macromolécule est formée d'une chaine phosphodiester entre une série de désoxyribonucléotides. Cette condensation se fait entre les acidités phosphoriques et les hydroxyles en 3′ et 5′ du sucre. La chaine polynucléotidique obtenue est donc linéaire et porte un motif séquentiel lié à l'ordre dans lequel sont rangées les bases (fig. 4). Ce motif est le support des caractères héréditaires.

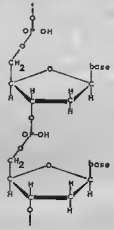


FIG. 4. — Structure primaire de l'ADN.

1.4.2 *Structure secondaire.*

WATSON et CRICK, pour expliquer les résultats de mesures de diffraction aux rayons X, ont émis l'hypothèse que la molécule d'ADN est

Source : MNHN, Paris

constituée par une double hélice formée par deux chaînes polynucléotidiques enroulées autour d'un axe commun. Ces deux chaînes sont maintenues au voisinage l'une de l'autre par des liaisons hydrogène entre les bases.

Cette structure, adoptée actuellement, admet que les bases sont appariées de telle sorte que, d'une part, adénine et thymine, et d'autre part, guanine et cytosine se correspondent d'une chaîne à l'autre.

Les deux chaînes portent donc des séquences de bases complémentaires. Les couples A-T et G-C sont représentés sur la figure 5.

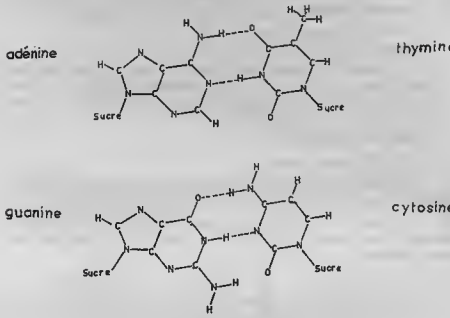


FIG. 5. — Appariement des bases A-T, G-C.

Ce modèle moléculaire a l'avantage de permettre d'interpréter, en particulier, les problèmes du code génétique et de la replication des acides nucléiques dans la cellule.

L'influence des facteurs physiques (température, pH, force ionique) sur la macromolécule et sur ses propriétés s'exerce au niveau des liaisons hydrogène et de l' « empilement » des bases.

II. — ROLE DES IONS MÉTALLIQUES

La présence, dans le milieu cellulaire, d'une certaine quantité d'ions métalliques, les oligoéléments, est bien connue; ils interviennent dans nombre de réactions biologiques; en particulier ils sont souvent indispensables pour que se réalise l'action catalytique d'un enzyme. Ils forment fréquemment des complexes ternaires enzyme-métal-substrat.

Source : MNHN, Paris

L'ion métallique se fixe d'une manière spécifique et gouverne la dynamique des réactions enzymatiques, les complexes formés étant sous l'influence des conditions de milieu et du stade de la réaction. Certains phénomènes de régulation biologique découlent directement de ces mécanismes.

Dans le cas des acides nucléiques, le rôle des ions métalliques semble double.

2.1 Intervention dans la structure de l'ADN.

Nous venons de voir qu'une molécule d'ADN est formée de chaînes phosphodiester. Les groupements phosphates résiduels sont ionisés en solution et la macromolécule se comporte comme un polyélectrolyte.

En outre, les liaisons hydrogène, responsables de la structure secondaire, dépendent des conditions de milieu et des réactions chimiques auxquelles participent les bases.

Pour ces raisons, les ions métalliques sont appelés à intervenir dans la structure de l'acide nucléique; ils ont un rôle de premier plan dans la stabilité de la double hélice, dont la conformation est, par ailleurs, déterminante pour l'activité biologique de l'ADN.

De nombreuses études ont porté sur l'influence de la force ionique sur la structure de l'ADN (1) - (5). D'autres auteurs ont mis en évidence l'effet des ions métalliques sur la stabilité thermique (6) - (7). Selon leur nature, ces ions agissent comme un stabilisant ou, au contraire, favorisent la dénaturation de la macromolécule, montrant ainsi une spécificité d'interactions et en particulier la possibilité, pour certains d'entre eux, de se fixer au niveau des bases.

2.2 Intervention dans certains mécanismes biologiques.

2.2.1 Deux types de travaux ont permis de montrer la présence de ces ions dans les acides nucléiques ou les complexes nucléoprotéiques :

a) Les méthodes directes d'analyse (8) - (11).

b) Les mesures magnétiques.

Blumenfeld en 1959 (12), par des mesures de résonance paramagnétique électronique, a signalé que les acides nucléiques et les complexes nucléoprotéiques contiennent des électrons célibataires; cette observation fut à l'origine de toute une série de travaux (13) - (19). Deux interprétations de ce fait furent proposées :

— d'une part, certains auteurs ont estimé que les signaux observés sont liés à la structure de la macromolécule et les ont attribués à des électrons libres délocalisés sur les bases.

— pour d'autres, au contraire, ces propriétés magnétiques sont dues à l'inclusion d'ions de transition sous une forme plus ou moins micellaire.

Cette dernière hypothèse semble, en définitive, devoir être retenue (20) - (23).

2.2.2 La présence simultanée, dans le milieu cellulaire, d'acides nucléiques et de certains ions métalliques permet d'envisager deux types d'interactions biologiquement importantes. Les macromolécules, avec

Source - MNHN, Paris

leur chaîne polyphosphate, peuvent se comporter comme une résine échangeuse d'ions, et par suite, régir la distribution des oligoéléments dans le milieu cellulaire. Les ions peuvent aussi participer à des réactions qui mettent en jeu les acides nucléiques. Quelques résultats, publiés dans la littérature, montrent qu'ils interviennent dans la formation des complexes nucléoprotéiques (24), favorisent l'action de certains enzymes sur les acides nucléiques (25) - (28) et, d'une manière générale, sont liés aux activités biologiques de ces derniers (29) - (32).

2.3 Étude de la fixation des ions métalliques.

Un certain nombre de chercheurs ont donc été conduits à étudier systématiquement les mécanismes de la fixation de ces ions et la nature des complexes formés, plus particulièrement dans le cas :

— du magnésium, qui joue un rôle essentiel dans les interactions acides nucléiques - enzymes hydrolysantes (33) - (35),
— du mercure II (36) - (39),
— des alcalins et alcalino-terreux (40) - (41),
— des terres rares (42) - (43),
— des ions de transition (44) - (47),
— d'ions divers (48) - (50).

III. — PLAN DE TRAVAIL

3.1 Objet des recherches.

Nous nous sommes attachés, essentiellement, à l'étude de la fixation des ions cuivrique et ferrique sur l'ADN. De plus, nous avons étudié, simultanément, les complexes formés avec les nucléosides et les nucléotides correspondants.

Notre choix s'est porté sur ces ions pour les raisons suivantes :

— leur importance biologique est considérable et leur comportement est souvent caractéristique de celui des principaux ions des métaux lourds. La connaissance des mécanismes chimiques élémentaires mis en jeu est susceptible d'éclairer un certain nombre de réactions biochimiques ou biologiques des acides nucléiques;
— l'absence de renseignements cohérents, lorsque nous avons abordé ce problème, rendait utile notre tentative d'élucider quelques-uns de ces mécanismes et d'essayer de déterminer les formules chimiques et les caractéristiques des équilibres qui interviennent dans ces réactions. Certaines données récentes sont parues sur ce sujet, nous les présenterons en même temps que nous discuterons nos propres résultats;
— ces ions, par ailleurs, sont essentiels pour les propriétés « magnétiques » des acides nucléiques, telles qu'elles ont été définies précédemment, plus particulièrement l'ion Fe^{3+} qui se rencontre dans tous les échantillons d'ADN;

Source - MNHN, Paris

— l'étude du mode de fixation du cuivre II peut servir de modèle aux interactions d'ions sous une forme non hydrolysée, contrairement à ce qui se passe avec le fer III, dans le domaine de pH où l'ADN est stable.

3.2 Méthodes utilisées.

Etant donné le caractère paramagnétique des ions Cu^{2+} et Fe^{3+}, il nous a paru intéressant d'utiliser la résonance paramagnétique électronique (RPE) pour l'étude de leurs complexes.

Cette méthode permet, en effet, de mettre en évidence les modifications magnétiques subies par les électrons libres. Elle est donc particulièrement bien adaptée à l'étude des complexes des ions de transition dont les propriétés magnétiques varient au cours des réactions chimiques auxquelles ils participent. Elle donne, en outre, des renseignements plus complets que les mesures de susceptibilité statique.

Peu de données existent actuellement sur l'utilisation de la RPE pour l'étude, en solution, de complexes métalliques; nous avons donc tenté de mettre au point une méthodologie pouvant être appliquée à de tels composés.

De plus, dans un certain nombre de cas, nous avons effectué des mesures potentiométriques et optiques; ces méthodes sont classiques pour l'étude des complexes métalliques.

3.3 Plan de travail.

Nous discuterons en détail, dans le chapitre suivant, les méthodes physiques et les procédés de calcul que nous avons utilisés. Nous présenterons ensuite les résultats obtenus relatifs à la fixation, sur l'ADN et sur ses monomères, de l'ion cuivrique, puis de l'ion ferrique.

Source : MNHN, Paris

CHAPITRE II

MÉTHODES DE MESURE ET PRINCIPES DES CALCULS UTILISÉS

I. — LA RÉSONANCE PARAMAGNÉTIQUE ÉLECTRONIQUE

La résonance paramagnétique électronique (RPE) permet l'étude des atomes, ions ou molécules qui possèdent des moments magnétiques électroniques permanents.

Les principaux domaines d'application sont : ions des éléments de transition ou de terres rares, radicaux libres, états triplets, réactions photochimiques, action des radiations ionisantes, défauts de réseaux, électrons de conduction, etc...

Dans le cas des molécules biologiques, cette méthode convient tout particulièrement à l'étude :

— de la structure des complexes métalliques des protéines ou des acides nucléiques,

— des radicaux formés lors de réactions d'oxydo-réduction ou d'ionisation,

— des états triplets liés aux transferts d'énergie ou aux réactions photochimiques,

— des complexes par transfert de charges.

Nous ne donnerons ci-dessous que le principe de cette technique qui a été développée dans de nombreux traités (51)-(59); nous insisterons sur son application aux complexes métalliques.

1.1 Le phénomène de résonance.

1.1.1 *Le modèle électromécanique de Bloch (fig. 6).*

Considérons un atome ou une molécule paramagnétique placée au sommet d'un système d'axes orthonormés. Nous appliquons un champ magnétique statique $\vec{H}_0$, dirigé selon *y'oy*. Le moment magnétique $\vec{M}$ de l'atome ou de la molécule considéré est animé d'un mouvement de précession, dit de Larmor, autour de la direction $\vec{H}_0$.

On montre, en mécanique classique, que ce mouvement possède une fréquence propre ν_0 telle que :

$$\nu_0 = \frac{\gamma H_0}{2\pi}$$

Source - MNHN, Paris

γ est une grandeur algébrique appelée rapport gyromagnétique.

$\gamma = \frac{M}{\sigma}$ où σ représente le moment cinétique total de l'atome ou de la molécule.

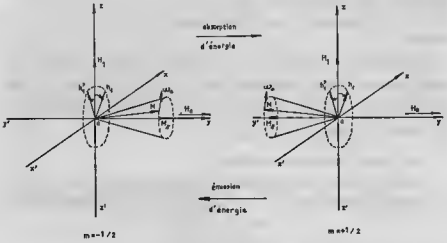


FIG. 6. — Modèle de BLOCH.

Si au champ $\vec{H_0}$ nous superposons, selon l'axe $z'oz$, un champ magnétique alternatif $\vec{H_1}$ de fréquence ν et d'intensité très inférieure à celle de $\vec{H_0}$, l'effet de la perturbation introduite par $\vec{H_1}$ sur le mouvement de $\vec{M}$ sera négligeable si ν est différente de ν_0.

Le champ alternatif sinusoïdal $\vec{H_1}$ peut être décomposé en $\vec{h_1}$ et $\vec{h'_1}$, d'amplitudes constantes égales à la moitié de la valeur maximale de celle de $\vec{H_1}$ et tournant en sens opposés dans le plan xoz, avec la vitesse angulaire $\pm \omega$,

$$\omega = 2\pi\nu.$$

La composante $\vec{h'_1}$, tournant en sens inverse de la précession de $\vec{M}$, aura un effet moyen nul sur le mouvement de ce dernier. Si la composante $\vec{h_1}$, qui tourne dans le même sens que $\vec{M}$, possède une vitesse angulaire ω nettement différente de ω_0, $\vec{h_1}$ et $\vec{M}$ ne peuvent rester en phase et ne réagissent pas l'une sur l'autre de façon notable. Par contre, si ω égale ω_0, le champ $\vec{h_1}$ soumet $\vec{M}$ à un couple qui tend à le faire passer dans la deuxième position permise : on dit qu'il y a résonance.

Le moment $\vec{M}$ possède une énergie maximale lorsqu'il est antiparallèle à $\vec{H_0}$; la résonance le fait basculer antiparallèlement au champ lorsqu'il se trouve initialement parallèle à $\vec{H_0}$, le système absorbe l'énergie $h\nu_0$;

Source MNHN, Paris

si inversement, $\vec{M}$ d'antiparallèle devient parallèle, le système perd de l'énergie, il y a alors émission, stimulée par $\vec{h\nu}$. Dans le cas de spins électroniques, la probabilité d'émission est cependant faible. Nous verrons que d'autres facteurs interviennent pour favoriser le passage du niveau le plus énergétique au niveau le plus stable.

1.1.2 *Relaxation longitudinale ou amortissement de l'aimantation statique.*

Considérons une population de N spins électroniques indépendants, occupant un volume de matière égale à l'unité; chaque centre est caractérisé par un moment cinétique de spin S = 1/2. Placés dans un champ magnétique $\vec{H}_0$, ces spins n'ont que deux orientations possibles du fait des conditions quantiques : $m = \frac{1}{2}$ et $m = -\frac{1}{2}$.

m : nombre quantique magnétique.

Ils sont orientés soit parallèlement, soit antiparallèlement à $\vec{H}_0$. Il y a donc décomposition en deux niveaux d'énergie Zeeman séparés par

$$\Delta w = g_e \cdot \beta \cdot H_0$$

g_e est appelé facteur de Landé,

β est le magnéton de Bohr.

La répartition des deux populations électroniques répond à l'équation statistique de Boltzmann :

$$\frac{N_2}{N_1} = e^{-\frac{\Delta W}{KT}}$$

N_1 population du niveau de moindre énergie,

N_2 population du niveau supérieur,

K constante de Boltzmann,

T température absolue.

A l'équilibre thermique, l'échantillon de matière possède un moment résultant $\vec{\mathcal{M}}$ parallèle au champ $\vec{H}_0$.

$$\vec{\mathcal{M}} = [N_1 - N_2] \cdot \vec{M}_{/}$$

$$\vec{\mathcal{M}} = \chi_0 \cdot \vec{H}_0$$

χ_0, la susceptibilité statique, varie avec la température du milieu.

L'excès de N_1 sur N_2 est toujours très faible même aux basses températures habituellement atteintes en laboratoire. La susceptibilité statique correspondante est donc faible.

Le système aura tendance à transmettre au milieu extérieur son excès d'énergie, par vibrations thermiques, pour retrouver l'équilibre initial. Si l'on cesse d'appliquer le champ $\vec{H}_0$, l'aimantation s'amortit. Ce processus

Source - MNHN, Paris

suit une loi exponentielle dont la constante de temps T_1 est appelée « temps de relaxation spin-réseau ». Le terme réseau représente tous les degrés de liberté du milieu ambiant, à l'exception du système de spins.

1.1.3 *Relaxation transversale ou amortissement de la résonance.*

Considérons un ensemble de N moments magnétiques de spins soumis à un champ H_0, les moments se répartissent au hasard sur un cône (fig. 7). En raison du léger excès de N_1 sur N_2, la résultante totale $\vec{\mathcal{M}}_0$ est colinéaire à $\vec{H}_0$. Lorsque l'on applique $\vec{H}_1$, perpendiculaire à $\vec{H}_0$ et que sa fréquence est ν_0, sa composante $\vec{h}_1$ tend à faire basculer un certain nombre de spins d'un état quantique à un autre, mais aussi à imposer une certaine cohérence de phase aux différents moments. Par suite, il apparaît, pour $\vec{\mathcal{M}}$, une résultante transversale dans le plan *xoz* qui tourne régulièrement à la vitesse angulaire ω_0.

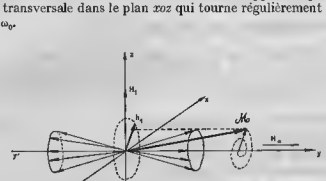


FIG. 7. — Relaxation transversale.

Dans une direction quelconque du plan *xoz*, il existe une magnétisation alternative sinusoïdale qui peut permettre de détecter le phénomène de résonance paramagnétique.

Lorsque le système est perturbé par la résonance, les populations N_2 et N_1 ne correspondent plus à celles observées à la température ambiante T. On définit une nouvelle température T_s ou température de spin du système, supérieure à T, telle que le rapport :

$$\frac{N_2}{N_1} = e^{-\frac{\Delta W}{KT_s}}$$

En même temps que l'échantillon absorbe l'énergie $h\,\nu_0$, il tend à retrouver son équilibre initial en cédant de l'énergie au milieu environnant.

Si l'on supprime $\vec{H}_1$, la cohérence de phase précédente, liée à la résonance, met un certain temps à disparaître. On retrouve une cinétique caractérisée par une constante de temps T_2 appelée temps de relaxation transversale ou encore « temps de relaxation spin-spin ».

Source - MNHN, Paris

Lorsque les phénomènes de relaxation sont suffisamment rapides pour équilibrer l'excitation artificielle, il s'établit un équilibre dynamique qui rend notable l'énergie absorbée. La résonance paramagnétique électronique consiste à induire, entre les sous-niveaux Zeeman d'une population de spins placée dans un champ $\overrightarrow{H_0}$, une transition à l'aide d'une onde électromagnétique de fréquence ν.

La condition de résonance, pour laquelle l'onde incidente est absorbée, est donnée par l'équation

$$h\,\nu_0 = g_e \cdot \beta \cdot H_0.$$

Pour un champ $\overrightarrow{H_0}$ de 3 600 gauss, valeur couramment obtenue en laboratoire, on utilise une onde du domaine hertzien ($\lambda = 3$ cm pour un électron libre caractérisé par $g_e = 2$).

1.2 Caractéristiques des spectres d'absorption.

Nous étudierons, dans des cas simples, les facteurs qui modifient la forme et la position de la raie de résonance. Nous étendrons ensuite ces résultats aux cas des complexes des ions de transition en solution ou sous forme de poudre amorphe.

Les paramètres qui définissent un spectre de résonance paramagnétique électronique sont :

1° la valeur de g ,

2° la structure fine ou hyperfine,

3° la largeur de la raie.

1.2.1 *Position de la raie.*

La position de la raie de résonance est déterminée par la valeur du facteur de Landé g , donnée par la relation :

$$g_e = 1 + \frac{J\,(J+1) + S\,(S+1) - L\,(L+1)}{2\,J\,(J+1)}$$

S, L, J représentent, respectivement, le moment cinétique de spin, le moment cinétique orbital et le moment cinétique total de l'atome considéré.

Dans le cas des ions métalliques, l'influence du champ cristallin conduit souvent à un blocage de l'orbite et à un découplage entre L et S qui enlève toute signification à J et g ; ce dernier se rapproche de la valeur 2 qu'il aurait dans le cas d'un spin totalement libre. Dans ces conditions, la formule

$$h\,\nu_0 = g_e \cdot \beta \cdot H_0$$

se transforme en remplaçant g_e par un facteur expérimental g appelé facteur de décomposition spectrale.

Ce facteur possède une expression complexe mais, pour les cristaux, peut s'exprimer en fonction des cosinus directeurs α, β et γ de $\overrightarrow{H_0}$ avec trois axes principaux, liés au réseau cristallin, pour lesquels g présente les valeurs g_x, g_y, g_z :

$$g^2 = \alpha^2 g_x^2 + \beta^2 g_y^2 + \gamma^2 g_z^2$$

Source MNHN, Paris

1.2.2 *Structure fine ou hyperfine.*

Lorsque l'atome possède un moment cinétique total J, l'application du champ magnétique conduit à la décomposition en $2J+1$ sous-niveaux, auxquels correspondent les nombres quantiques magnétiques $-J < m < +J$. Selon les règles de sélection de Rabinowitch, des transitions entre ces sous-niveaux sont possibles si $\Delta m = \pm 1$, ou 0. Le spectre de résonance sera donc formé de $2J+1$ raies élémentaires.

De même, le noyau de l'atome étudié a parfois un spin I et un moment magnétique nucléaire. Le couplage avec le moment magnétique électronique subdivise chaque niveau électronique en $2I+1$ sous-niveaux correspondant aux $2I+1$ valeurs du nombre quantique nucléaire m_i. Chaque raie élémentaire précédente est décomposée en $2I+1$ composantes hyperfines très rapprochées, dues aux transitions électroniques $\Delta m_i = \pm 1$.

1.2.3 *Largeur de la raie.*

D'une manière générale, la forme de la raie de résonance est fonction de trois facteurs (55). Ce sont :

— le temps de relaxation spin-réseau,
— les interactions spin-spin,
— les interactions d'échange.

a) Équation de la raie de résonance.

L'étude théorique de la résonance peut être abordée par la résolution des équations de Bloch représentant le mouvement du moment résultant :

$$\frac{d\overrightarrow{\mathcal{M}_x}}{dt} = \gamma \cdot (\overrightarrow{H_0} \wedge \overrightarrow{\mathcal{M}})_x - \frac{\overrightarrow{\mathcal{M}_x}}{T_2} ;$$

$$\frac{d\overrightarrow{\mathcal{M}_z}}{dt} = \gamma \cdot (\overrightarrow{H_0} \wedge \overrightarrow{\mathcal{M}})_z - \frac{\overrightarrow{\mathcal{M}_z}}{T_2} ;$$

$$\frac{d\overrightarrow{\mathcal{M}_y}}{dt} = \gamma \cdot (\overrightarrow{H_0} \wedge \overrightarrow{\mathcal{M}})_y - \frac{\overrightarrow{\mathcal{M}_y}}{T_1} - \frac{\overrightarrow{\mathcal{M}_0}}{T_1} ;$$

La résolution de ces équations (56) permet d'obtenir l'expression de la susceptibilité complexe $\chi = \chi' - j\chi''$; $(j = \sqrt{-1})$

$$\chi' = \frac{1}{2} \chi_0 \omega_0 T_2 \cdot \frac{T_2 (\omega_0 - \omega)}{1 + T_2^2 (\omega_0 - \omega)^2 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2}$$

$$\chi'' = \frac{1}{2} \chi_0 \omega_0 T_2 \cdot \frac{1}{1 + T_2^2 (\omega_0 - \omega)^2 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2}$$

χ'' est proportionnel à l'énergie absorbée,
χ' correspond au phénomène de dispersion qui accompagne toujours l'absorption d'énergie au voisinage de la résonance.

Source : MNHN, Paris

— $\gamma^2 H_1^2 T_1 T_2 \ll 1$.

L'équation normalisée qui représente la forme de la raie

$$\int_0^\infty g(\omega - \omega_0)\, d\omega = 1$$

est de la forme :

$$g(\omega - \omega_0) = \frac{T_2/\pi}{1 + (\omega - \omega_0)^2 \cdot T_2^2}$$

elle correspond à une courbe d'absorption lorentzienne; la largeur à mi-hauteur $\Delta\omega$ est égale à $\frac{1}{T_2}$; T_2 apparaît alors comme π fois la hauteur maximale de $g(\omega - \omega_0)$.

— $\gamma^2 H^2 T_1 T_2$ n'est plus négligeable.

Dans ces conditions, les électrons portés sur le niveau supérieur ne peuvent retomber suffisamment rapidement sur le niveau fondamental. La différence de population entre les deux niveaux diminue, ainsi que la puissance absorbée. Ce phénomène, appelé saturation de la résonance, se traduit par une diminution relative de l'intensité du signal et par un élargissement de la raie. La largeur à mi-hauteur $\Delta\omega$ est une fonction de $1/T_1$ et $1/T_2$.

b) Interactions spin-spin.

Van Vleck puis Pryce et Stevens ont traité cette question.

L'expression de la largeur quadratique moyenne de la raie, dans le cas d'interactions électroniques, s'écrit :

$$(\Delta H)^2 = \frac{3}{4} S(S+1) g^2 \beta^2 \cdot \Sigma \frac{(1 - 3\cos^2\theta)^2}{r^3}.$$

Les interactions de ce type provoquent un élargissement de la raie qui devient approximativement gaussienne. Son équation normalisée s'écrit :

$$g(\omega - \omega_0) = \frac{T_2}{\pi} \cdot e^{-(\omega - \omega_0)^2 \cdot T_2/\pi}$$

T_2 est toujours défini comme π fois la valeur maximale de $g(\omega - \omega_0)$.

c) Interactions d'échange.

Le principe d'incertitude montre qu'un électron peut être localisé sur plusieurs atomes voisins, ce qui entraîne un couplage d'échange. Ce phénomène intervient dans toute association, il est particulièrement important lors de la formation de liaisons chimiques. Il détermine un rétrécissement de la raie de résonance au voisinage du maximum d'absorption et un élargissement des bords de la raie.

1.2.4 *Cas des complexes métalliques en solution.*

Les interprétations théoriques des spectres des ions de transition en solution ne sont pas simples. Dans ce qui suit, nous nous efforcerons de définir qualitativement l'influence de la liaison covalente sur les spectres de résonance des complexes en solution.

Source - MNHN, Paris

a) Influence sur la position de la raie.

Du fait de l'agitation thermique, les molécules sont réparties au hasard. Le facteur g prend une valeur moyenne isotrope.

D'après les résultats obtenus sur les complexes cristallisés, on peut admettre que la formation de liaisons chimiques a les effets suivants (55) :

— la contribution orbitale est réduite dans la valeur du facteur g;

— la contribution du couplage spin-orbite dans ce facteur subit une réduction du second ordre.

b) Influence sur la forme de la raie.

Bien qu'il soit difficile de préciser l'importance relative des différentes interactions étudiées précédemment, il est possible de considérer que la formation d'une liaison chimique :

— diminue le temps de relaxation spin-réseau T_{1e}, ce qui réduit le phénomène de saturation lorsqu'il existe,

— diminue les interactions spin-spin,

— accroît les interactions d'échange.

Nous n'aborderons pas l'influence de ces liaisons chimiques sur les structures fines et hyperfines que nous n'avons pas rencontrées dans nos mesures.

c) Conclusions.

D'après ce qui précède, lorsque des complexes se forment, nous pouvons nous attendre à :

— une diminution du facteur g;

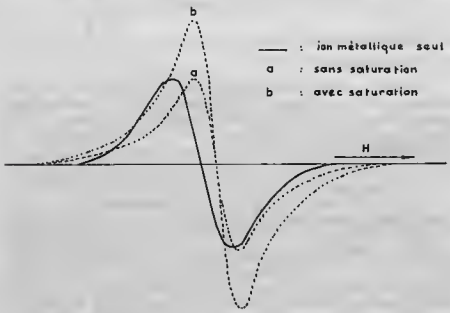


Fig. 8. — Influence de la liaison covalente en RPE.

Source : MNHN, Paris

— un accroissement de l'intensité relative du signal, lorsque l'ion métallique subit le phénomène de saturation (cas de l'ion ferrique);

— une diminution de la largeur de la raie de résonance.

Cet ensemble de modifications est d'autant plus important que la stabilité du complexe est plus grande. Certaines exceptions à cette règle ont cependant été signalées par H. Rein et coll. (61), dans l'étude d'une série de complexes du cuivre sous forme polycristalline.

Sur la figure 8, nous avons résumé ces effets. Nous avons représenté les courbes dérivées, telles qu'elles sont fournies par l'appareil.

Les critères que nous venons de poser nous permettront, dans une certaine mesure, de déterminer la stabilité croissante des complexes d'une série homologue.

1.2.5 *Caractère linéairement additif des spectres de RPE.*

L'intensité de résonance est proportionnelle au nombre de spins présents; d'après ce qui précède, chaque composé est caractérisé par une absorption de résonance spécifique, proportionnelle à sa concentration. Par suite, si plusieurs composés paramagnétiques sont simultanément en présence, ce qui est le cas des complexes en solution, le spectre de résonance est la somme de tous les spectres.

Pour une certaine valeur de H, l'intensité d'absorption est donc une propriété additive de ces composés. Chaque espèce paramagnétique possède un coefficient moléculaire de résonance magnétique ε_i, analogue aux coefficients moléculaires d'absorption définis en spectrophotométrie.

Pour un mélange de N composés et pour H fixé (donc g), nous pouvons écrire la relation linéaire :

$$h_g = \sum_N \cdot \varepsilon_i \cdot c_i$$

h_g : intensité de résonance mesurée pour la valeur g;

c_i : concentration du composé I.

En toute rigueur, ε_i n'est pas indépendant de c_i du fait des interactions mutuelles entre les molécules. Des travaux récents (72) ont cependant montré que nous pouvons, en première approximation, négliger ce fait lorsque les concentrations utilisées sont faibles et que la température est sensiblement constante.

Cette caractéristique des spectres de RPE nous permettra d'appliquer, aux mesures de résonance, les méthodes classiques d'étude des complexes en solution, élaborées principalement dans le cas des mesures optiques (60).

Il est à noter que l'intensité h_g dépend de multiples facteurs (coefficients d'amplification, amplitude de modulation, puissance du klystron, absorption diélectrique dans la cavité), elle ne possède pas d'unité, contrairement à son homologue, la densité optique mesurée en spectrophotométrie. Les ε_i ne sont donc déterminés qu'à une constante multiplicative près. Seules leurs valeurs relatives sont indépendantes des conditions expérimentales. Le facteur de correction peut être obtenu par un étalonnage de l'appareil avec une solution de l'ion paramagnétique considéré, en l'absence d'agent complexant, comme nous le verrons ultérieurement.

Source - MNHN, Paris

1.3 Principe d'une expérience de RPE.

1.3.1 *Principe d'une mesure.*

En pratique, une mesure de RPE est réalisée de la manière suivante :

L'échantillon est placé dans l'entrefer d'un électroaimant qui fait varier linéairement le champ H auquel est soumise la substance. Le champ alternatif H_1 est celui d'une onde située dans la bande X ($\lambda = 3$ cm), dont on étudie l'absorption par l'échantillon. Cette onde provient d'un klystron et, par l'intermédiaire de guides d'onde, arrive dans une cavité résonante contenant la substance.

Pour obtenir une interaction maximale avec H_1, on forme des ondes stationnaires dans le système de guides d'onde. Lorsque la condition de résonance $h\nu = g \cdot \beta \cdot H$ est réalisée, il y a absorption d'énergie. On mesure les variations du coefficient de réflexion de la cavité. Sur la figure 9 nous avons schématisé cette expérience.

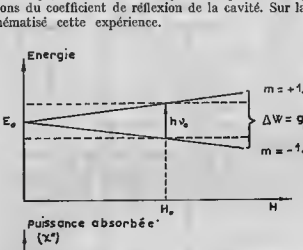


FIG. 9. — Principe de la RPE.

Il serait théoriquement possible de fixer la valeur du champ statique et de faire varier la fréquence de l'onde incidente, mais ce système est difficilement réalisable.

1.3.2. *Principe du spectromètre* (fig. 10).

Nous avons utilisé un spectromètre Varian 4 502 ; cet appareil comprend trois parties :

— une partie magnétique : constituée d'un électroaimant dont le champ stabilisé à 10^{-4} varie de 0 à 4 500 gauss;

— une partie hyperfréquence : le klystron, les guides d'onde, la cavité de mesure et le détecteur. La fréquence est stabilisée par un dispositif automatique (AFC);

Source : MNHN, Paris

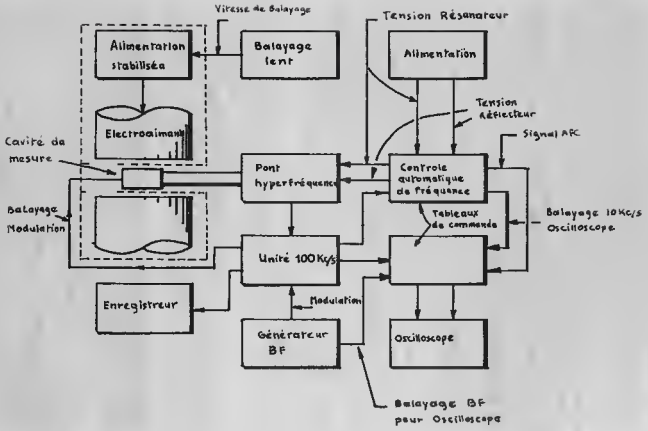


FIG. 10. — Principe du spectromètre.

Source : MNHN, Paris

— une partie électronique : qui permet de détecter, d'amplifier et d'enregistrer le signal. Pour cela, le champ magnétique statique H est modulé à l'aide de bobines auxiliaires placées dans les parois de la cavité de mesure. Ce dispositif, qui autorise une amplification commode, conduit cependant à la dérivée de la courbe d'absorption. La modulation est effectuée à 100 kc/s.

1.3.3 *Cas des solutions aqueuses.*

Pour des mesures en solution, nous avons utilisé les cellules de l'appareil. Elles ont une épaisseur de 0,25 mm et sont situées dans l'un des compartiments d'une double cavité.

L'étalonnage du champ est fait soit avec un échantillon de peroxylamine disulfonate de sodium, soit à l'aide d'un gaussmètre à résonance nucléaire.

Lors de mesures quantitatives, dans le cas de l'ion cuivrique, nous avons été amenés à corriger les spectres de la manière suivante :

Un léger changement de la position de la cellule dans la cavité, au cours de l'enregistrement d'une série de spectres homologues, se traduit par une variation de l'absorption diélectrique; par suite, l'intensité du signal subit une modification par affinité orthogonale, d'où une appréciation erronée de cette intensité pouvant atteindre 10 %.

Si l'on considère que la surface du signal, au cours d'une série de mesures, est proportionnelle au nombre de centres magnétiques (pour des susceptibilités voisines), elle doit varier comme la concentration totale en cuivre, lorsque le phénomène de saturation est négligeable et qu'il ne se forme pas d'espèces diamagnétiques. Le coefficient linéaire de correction appliqué à une intensité mesurée est donc égal au rapport surface théorique/surface mesurée. Nous avons pu constater que, grâce à cette correction, il est possible de comparer une série homologue de spectres avec une précision d'environ 2 %.

Ce qui précède ne pourra s'appliquer à l'ion ferrique, certaines des espèces formées étant diamagnétiques.

II — APPLICATION D'UNE PROPRIÉTÉ PHYSIQUE LINÉAIREMENT ADDITIVE A L'ÉTUDE DES COMPLEXES MÉTALLIQUES

2.1 Généralités.

2.1.1 *Complexes mononucléaires.*

Soit M un ion métallique pouvant se combiner à n molécules A, donnant des électrons. Si on admet la formation de complexes successifs ne contenant qu'un seul atome de M, les équilibres suivants sont mis en jeu. (Dans tout ce qui suivra, les quantités entre crochets représenteront les concentrations des composés en solution.)

$$[M] + [A] \rightleftharpoons [MA]$$

$$[MA] + [A] \rightleftharpoons [MA_2]$$

$$[MA_{n-1}] + [A] \rightleftharpoons [MA_n]$$

Source - MNHN, Paris

Les constantes de stabilité « partielles » correspondant à ces équilibres, qui représentent la loi d'action de masse, s'écrivent :

$$K_1 = \frac{[MA]}{[M] \cdot [A]} \; ; \quad K_2 = \frac{[MA_2]}{[MA] \cdot [A]} \; ; \quad K_n = \frac{[MA_n]}{[MA_{n-1}] \cdot [A]}$$

En toute rigueur, il faudrait considérer les activités et non les concentrations; cependant, si l'on fixe, à l'aide d'un électrolyte ne participant pas aux équilibres chimiques, la force ionique à une valeur nettement supérieure aux concentrations des complexes en présence, les activités restent inchangées. Les constantes de stabilité calculées à partir des concentrations ont alors un sens, pour la force ionique utilisée.

La constante « globale » de stabilité du complexe de rang j est donnée par :

$$\beta_j = K_1 \times K_2 \times \ldots . K_j = \frac{[MA_j]}{[M] \cdot [A]^j}$$

2.1.2 *Complexes polynucléaires.*

Si les composés formés contiennent i ions du métal, on a :

$$i\,[M] + j\,[A] \rightleftharpoons [M_i\,A_j]$$

d'où la constante « globale » de stabilité :

$$\beta_{ij} = \frac{[M_i\,A_j]}{[M]^i \cdot [A]^j}$$

2.1.3 *Complexes mixtes.*

Un même atome métallique est susceptible de se lier à plusieurs agents complexants A et B pour former un composé de formule $M_i\,A_j\,B_k$; ceci se produit par exemple dans le cas de complexes hydroxylés où les groupements B représentent les OH fixés sur le complexe. Dans ce cas :

$$\beta_{ijk} = \frac{[M_i\,A_j\,B_k]}{[M]^i \cdot [A]^j \cdot [B]^k}$$

Pour expliquer les résultats expérimentaux relatifs aux équilibres qui régissent le système ADN-cuivre-Nitroso R, nous avons dû envisager la formation d'un tel complexe ternaire.

2.1.4 *Equations qui régissent les équilibres chimiques.*

Lorsque plusieurs composés ou complexes sont en équilibre dans une solution, il est possible de décrire ce système, c'est-à-dire de déterminer toutes les concentrations des composés en équilibre pour un état donné, en utilisant les équations suivantes.

En appelant $[M]_T$ et $[A]_T$ les concentrations totales des ions initialement en solution :

$$[M]_T = [M] + \sum_i i\,[M_i\,A_j]$$

$$[A]_T = [A] + \sum_j j\,[M_i\,A_j]$$

Source - MNHN, Paris

Ces deux équations représentent les bilans des concentrations. En outre, selon la loi d'action de masse :

$$\beta_{ij} = \frac{[M_i\, A_j]}{[M]^i \cdot [A]^j}$$

Nous avons donc autant d'équations que d'inconnues si tous les β_{ij} sont connus. Le système peut alors être résolu. Pratiquement, dès que le nombre d'inconnues augmente notablement, les calculs deviennent très difficiles. Nous verrons ultérieurement la méthode que nous avons appliquée au cas du système ADN-cuivre-Nitroso R; elle peut être étendue à un grand nombre de problèmes.

2.2 Étude d'une propriété physique linéairement additive d'un système en équilibre chimique.

Rossotti et Rossotti, dans leur ouvrage (60) relatif au calcul des constantes de stabilité, ont étudié les différentes méthodes utilisables. Il est généralement possible de connaître les concentrations d'un certain nombre de composés en présence, à partir d'une propriété physique particulière du système considéré. Nous nous limiterons dans ce qui suit au cas de mesures d'une propriété linéairement additive appliquée à l'existence de complexes mononucléaires ($i = 1$).

Ces propriétés seront, soit une densité optique pour une longueur d'onde déterminée, soit une intensité de résonance paramagnétique pour un facteur g fixé. Nous détaillerons le cas de mesures spectrophotométriques, l'extension à la RPE se fait en remplaçant la densité optique par l'intensité de résonance.

2.2.1 *Cas d'un complexe unique.*

a) Considérons le complexe de formule MA_n se formant selon l'équilibre :

$$[M] + n\,[A] \rightleftharpoons [M\,A_n]$$

et la constante « globale » de stabilité :

$$\beta_n = \frac{[MA_n]}{[M] \cdot [A]^n} \qquad (1)$$

Généralement, il est possible de trouver une longueur d'onde à laquelle l'agent complexant n'absorbe pas. Si nous représentons par ε le coefficient moyen d'extinction de la solution, d'après la loi d'additivité il est possible d'écrire pour la densité optique :

$$d = \varepsilon \cdot [M]_T = [M] \cdot \varepsilon_M + [MA_n] \cdot \varepsilon_{MA_n} \qquad (2)$$

$[M]_T$, $[A]_T$: concentrations initiales en métal et en agent complexant, ε_M, ε_{MA_n} : coefficients moléculaires d'extinction des espèces absorbantes.

$$[M]_T = [M] + [MA_n] \qquad (3)$$

$$[A]_T = [A] + n\,[MA_n] \qquad (4)$$

Source : MNHN, Paris

en portant la valeur de [M], tirée de (3), dans (2).

$$\bar{\varepsilon}\cdot[M]_T = [M]_T\cdot\varepsilon_M - [MA_n]\cdot\varepsilon_M + [MA_n]\cdot\varepsilon_{MA_n} \tag{5}$$

d'où

$$[MA_n] = [M_T]\cdot\frac{(\bar{\varepsilon}-\varepsilon_M)}{(\varepsilon_{MA_n}-\varepsilon_M)} \tag{6}$$

$$[M] = [M]_T - [M]_T\cdot\frac{(\bar{\varepsilon}-\varepsilon_M)}{(\varepsilon_{MA_n}-\varepsilon_M)} = [M]_T\cdot\frac{(\varepsilon_{MA_n}-\bar{\varepsilon})}{(\varepsilon_{MA_n}-\varepsilon_M)} \tag{7}$$ et

(1) donne :

$$\beta_n = \frac{(\bar{\varepsilon}-\varepsilon_M)}{(\varepsilon_{MA_n}-\bar{\varepsilon})}\cdot\frac{1}{[A]^n} \tag{8}$$ qui se transforme en :

$$\frac{1}{\beta_n\cdot[A]^n} = \frac{(\varepsilon_{MA_n}-\bar{\varepsilon})}{(\bar{\varepsilon}-\varepsilon_M)} = \frac{(\varepsilon_{MA_n}-\varepsilon_M)}{(\bar{\varepsilon}-\varepsilon_M)} - 1 \tag{9}$$

en divisant les deux membres par $(\varepsilon_{MA_n}-\varepsilon_M)$:

$$\frac{1}{(\bar{\varepsilon}-\varepsilon_M)} = \frac{1}{(\varepsilon_{MA_n}-\varepsilon_M)\,\beta_n}\cdot\frac{1}{[A]^n} + \frac{1}{(\varepsilon_{MA_n}-\varepsilon_M)} \tag{10}$$

ε_M peut être déterminé sur une solution de sel métallique de concentration connue.

En portant les valeurs expérimentales de $1/(\bar{\varepsilon}-\varepsilon_M)$ en fonction de $1/[A]^n$, on obtient une droite dont l'ordonnée à l'origine permet de calculer le coefficient moléculaire du complexe et la pente de la droite, la constante β_n. Généralement les valeurs de [M] et de [A] sont inconnues. Les calculs précédents sont exécutés en prenant pour [A] les valeurs de $[A]_T$, d'où ε_{MA_n} approchée. Avec les équations (3), (4) et (5), on précise la valeur de [A] puis de ε_{MA_n}. Une série d'approximations successives permet de trouver les valeurs convenables pour ε_{MA_n} et β_n.

b) Nous envisagerons le cas particulier où la concentration totale en agent complexant est inconnue et où les concentrations en métal libre et complexé peuvent être déduites de l'expérience : il en sera ainsi lorsque nous étudierons les complexes ADN-cuivre, le nombre de sites actifs étant indéterminé.

En supposant que le complexe formé a pour formule MA. Les équations (1) et (4) deviennent :

$$\beta_1 = \frac{[MA]}{\left[[A]_T - [MA]\right]\cdot[M]} \tag{11}$$

qui se transforme en :

$$[M] = \frac{[M]}{[MA]}\cdot[A]_T - \frac{1}{\beta_1} \tag{12}$$

Source : MNHN, Paris

Par suite, β_1 et $[A]_T$ sont tirées, respectivement, de l'ordonnée à l'origine et de la pente de la fonction expérimentale $[M] = f([M]/[MA])$.

Si le complexe a une formule différente ou si plusieurs composés sont simultanément en présence, nous n'obtenons plus une droite. La linéarité de cette fonction est donc une condition nécessaire et suffisante pour que le complexe soit unique et possède la formule MA.

2.2.2 *Cas de deux complexes simultanés.*

Nous envisagerons le cas simple où seuls se trouvent en présence les complexes 1-1 et 1-2. Ceci se produira, par la suite, lors de l'étude des complexes désoxyguanosine-cuivre par RPE et Nitroso R-cuivre par spectrophotométrie.

$$[M]_T = [M] + [MA] + [MA_2] \tag{13}$$

$$[A]_T = [A] + [MA] + 2[MA_2] \tag{14}$$

$$\beta_1 = \frac{[MA]}{[M]\cdot[A]} \; ; \qquad \beta_2 = \frac{[MA_2]}{[M]\cdot[A]^2} \tag{15}$$

(13) se transforme en :

$$[M]_T = [M]\cdot[1 + \beta_1\cdot[A] + \beta_2\cdot[A]^2] \tag{16}$$

en outre,

$$d = \varepsilon_0'\cdot[M] + \varepsilon_1\cdot[A] + \varepsilon_1\cdot[MA] + \varepsilon_2\cdot[MA_2] \tag{17}$$

en pratique, nous pourrons négliger ultérieurement ε_0 et ε_1.

En tenant compte de (16) et (17) :

$$\bar{\varepsilon} = \frac{d}{[M]_T} = \frac{\varepsilon_1\beta_1[A] + \varepsilon_2\beta_2[A]^2}{1 + \beta_1[A] + \beta_2[A]^2} \tag{18}$$

Pour résoudre ces équations, on considère que la proportion du complexe 1-1 est la plus grande quand [A] est petit et que le complexe 1-2 se forme surtout pour [A] grand. Il est possible, dans ces conditions, d'appliquer l'équation (10) en admettant que chaque complexe est seul lorsque l'on extrapole les valeurs de $\frac{1}{\bar{\varepsilon}}$ vers [A] petit ou [A] grand. On peut alors obtenir des valeurs approchées pour ε_1, ε_2, β_1 et β_2. Les équations (13), (14) et (15) permettent d'améliorer les valeurs numériques, par approximations successives. Ce calcul est long mais donne généralement des résultats satisfaisants.

2.2.3 *Cas d'un complexe ternaire.*

Avec le système ADN-cuivre-Nitroso R (*), nous serons en présence de deux types d'agents complexants :

— le Nitroso R forme avec le cuivre des complexes 1-1 et 1-2; les équations correspondantes découlent du paragraphe précédent.

(*) Nitroso-1 naphtol-2 disulfonate-3,6 de sodium.

Source : MNHN, Paris

— l'ADN natif conduit à un complexe 1-1 répondant aux caractéristiques définies au paragraphe 2.2.1 *b*. En juxtaposant ces deux systèmes, on arrive à un ensemble d'équations que nous avons pu résoudre à l'aide d'une machine à calculer CAB 500. Nous développerons ici les équations détaillées et le procédé de calcul que nous avons utilisés. Ceci sera justifié au Chapitre III.

Pour interpréter nos résultats expérimentaux, nous avons envisagé la formation d'un complexe ternaire dans lequel l'ADN et le Nitroso R sont liés par l'intermédiaire de l'ion cuivrique. Nous appellerons :

Cu N et Cu N_2 les complexes 1-1 et 1-2 du Nitroso R.

S le nombre de sites libres de l'ADN.

S Cu le complexe de l'ADN et du cuivre.

S Cu N le complexe ternaire de formule 1-1-1.

Le Nitroso R présente un pK_a pour sa fonction complexante « nitroso-naphtol »; il faut donc considérer les formes NH et N de cette fonction acide. Nous avons opéré à pH 5,5, et maintenu constantes les concentrations en cuivre total $[Cu_0]$ et en ADN ($[S_0]$ est la concentration totale en site actif vis-à-vis de l'ion cuivrique). Seule la concentration totale en Nitroso R varie; pour la solution de numéro n, elle est égale à $[N_0]_n$.

Les spectres de RPE de ces solutions présentent tous un minimum pour $g = 2{,}076$; nous avons étudié les variations de l'intensité h_n correspondante. Nous n'aurons à considérer que les coefficients moléculaires de résonance des composés Cu, Cu N, Cu N_2 et S Cu N, les autres substances ayant une contribution paramagnétique négligeable.

Les équations qui régissent les équilibres existant dans la solution n, déduites des paragraphes précédents, deviennent :

(19) $$pH = 5{,}5$$

(20) $$\frac{[NH]_n}{[N]_n \cdot [H]} = \frac{1}{K_a}$$

(21) $$\frac{[Cu\ N]_n}{[Cu]_n \cdot [N]_n} = \beta_1$$

(22) $$\frac{[Cu\ N_2]_n}{[Cu]_n \cdot [N]_n^2} = \beta_2$$

(23) $$\frac{[S\ Cu]_n}{[S]_n \cdot [Cu]_n} = K_e$$

(24) $$\frac{[S\ Cu\ N]_n}{[S]_n \cdot [Cu\ N]_n} = K_T$$

les équations des bilans s'écrivent :

(25) $$[Cu_0] = [Cu]_n + [Cu\ N]_n + [Cu\ N_2]_n + [S\ Cu]_n + [S\ Cu\ N]_n$$

(26) $$[N_0]_n = [N]_n + [NH]_n + [Cu\ N]_n + 2\,[Cu\ N_2]_n + [S\ Cu\ N]_n$$

(27) $$[S_0] = [S]_n + [S\ Cu]_n + [S\ Cu\ N]_n$$

Source - MNHN, Paris

K_ε, β_1, β_2, K_δ et $[S_0]$ sont tirées d'expériences préliminaires sur les systèmes ADN-cuivre et Nitroso R-cuivre. Seule K_T est inconnue. Le système, présentant 9 équations à 10 inconnues, est indéterminé. Les spectres de RPE donnent une équation supplémentaire :

$$(28) \quad h_n = \varepsilon_0 [Cu]_n + \varepsilon_1 [Cu\,N]_n + \varepsilon_2 [Cu\,N_2]_n + \varepsilon_3 [S\,Cu\,N]_n$$

On obtient ε_0, ε_1 et ε_2 en étudiant le système Nitroso R-cuivre. Cette équation supplémentaire ne lève pas l'indétermination puisque ε_3 est inconnue. Chaque valeur de n mène à une fonction $f(K_T, \varepsilon_3)_n = 0$.

Pour résoudre ce problème, nous avons attribué à K_T une série arbitraire de valeurs $K_{T_1}, K_{T_2}, \ldots K_{T_i}$. Pour chaque K_{T_i} toutes les concentrations des composés en présence sont calculées à partir des équations (19)-(27). Par suite (28) donne n valeurs pour ε_3. S'il est possible de trouver une valeur de K_{T_i} telle que $(\varepsilon_3)_n$ présente une dispersion minimale pour tous les points expérimentaux (cette dispersion est due aux erreurs expérimentales sur h_n), les valeurs correspondantes de K_T et $(\overline{\varepsilon_3})_n$ sont solutions du système précédent.

Les méthodes mathématiques utilisées sont développées en Annexe; les résultats seront présentés au Chapitre III.

III. — MESURES POTENTIOMÉTRIQUES APPLIQUÉES AUX COMPLEXES DE L'ION FERRIQUE

Pour suivre la formation des complexes de l'ion Fe^{3+} avec les désoxyribonucléosides et les désoxyribonucléotides, nous avons dû faire un certain nombre de mesures potentiométriques en milieu acide et en particulier calculer les constantes d'hydrolyse de cet ion.

3.1 **Conditions expérimentales.**

Nous avons mesuré simultanément le pH des solutions et le potentiel du couple oxydo-réducteur $Fe^{3+} \rightleftharpoons Fe^{2+}$.

La force ionique est maintenue constante, de sorte que toutes les solutions soient 10^{-1} M en ion perchlorate. Cet ion est généralement considéré, dans la littérature, comme n'exerçant aucune influence notable sur les complexes de l'ion Fe^{3+}. L'utilisation d'une force ionique élevée, devant les concentrations des composés en présence, fixe les activités au cours des mesures. On peut donc les remplacer par les concentrations. Les constantes de stabilité obtenues ne sont, cependant, valables que pour la force ionique 10^{-1}M.

La concentration en ion Fe^{3+} libre est mesurée à l'aide d'une électrode de platine. Une électrode au calomel sert de référence. La chaîne de mesure, analogue à celle d'Hedström (qui, le premier, a effectué des déterminations potentiométriques convenables sur les produits d'hydrolyse du fer en milieu acide (62)), est la suivante :

$$Hg, Hg_2Cl_2 \,|\, 4\text{ M NaCl} \,|\, 3\text{ M } NaClO_4 \,\Big|\, \begin{matrix} Fe^{3+} \rightleftharpoons Fe^{2+} \\ ClO_4^-,\ 10^{-1}\text{ M} \end{matrix} \,\Big|\, Pt.$$

Source : MNHN, Paris

Le potentiomètre A.O.I.P. donne la tension à 0,1 mV près. L'électrode de platine a été soigneusement étalonnée, pour des concentrations en ion ferrique comprises entre 10^{-8} M et 10^{-1} M, et, en ion ferreux entre 10^{-4} M et 10^{-2} M. Dans toute cette zone, à l'aide des droites $E = f(c)$, dont les pentes « m » sont très voisines de la valeur théorique 59,16 , nous avons pu calculer les concentrations en ion Fe^{3+} d'après l'équation :

$$E = E_0 + m \log (Fe^{2+}/Fe^{3+}) \qquad (38)$$

Le pH-mètre, à 1/1000e d'unité pH près, de marque E.I.L., est muni d'un électromètre « Vibron ». Avec le montage de la figure 11, le « Vibron » sert d'appareil de zéro dans la mesure du potentiel d'oxydo-réduction.

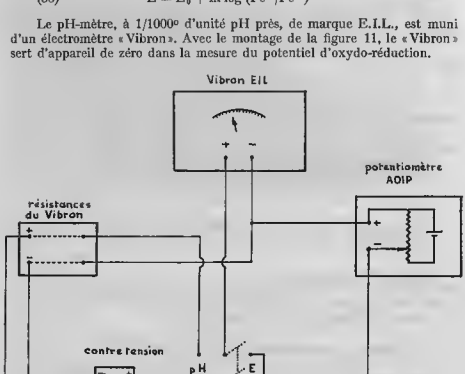


Fig. 11. — Montage potentiométrique.

Toutes les mesures sont faites sous courant d'azote, purifié par passage sur tournure de cuivre à 400° et réhydraté dans une solution 10^{-1} M en $NaClO_4$. La cellule de mesure est thermostatée à 20°C.

Source : MNHN, Paris

Les solutions de fer ferreux proviennent de l'attaque directe de fer métallique par l'acide perchlorique. Elles sont conservées en présence de quelques grains métalliques, afin de rester en milieu réducteur. La concentration en Fe^{3+}, d'après le potentiel de l'électrode de platine, est alors très faible ($< 10^{-7}$ M). Elles sont dosées, au moment de l'emploi, par le permanganate de potassium. Selon les travaux d'HEDSTRÖM, cités précédemment, la concentration en Fe^{3+}, fixée à 10^{-3}M, n'est pas influencée au cours des mesures d'hydrolyse par les complexes ferriques formés.

Les solutions ferriques sont obtenues en oxydant les solutions ferreuses par l'eau oxygénée. L'excès de réactif est détruit par ébullition prolongée. Elles sont dosées, colorimétriquement, par le dihydroxy-1,2 benzène disulfonate-3,5 de sodium.

3.2 **Méthodes de calcul appliquées à l'étude de l'hydrolyse acide de l'ion ferrique.**

L'hydrolyse de l'ion Fe^{3+} a fait l'objet de nombreux travaux (62) à (68). Tous les auteurs s'accordent à considérer que ceux d'HEDSTRÖM (effectués pour une force ionique 3 M en $NaClO_4$) font autorité. Opérant avec une force ionique 10^{-1}M, nous avons dû reprendre cette expérimentation; les conditions d'HEDSTRÖM auraient difficilement été applicables pour des nucléosides, nucléotides et pour l'ADN.

Tous les calculs ayant été décrits en détail par l'auteur précédent, nous ne rappellerons ici que ceux qui sont essentiels à la compréhension des résultats présentés au chapitre IV. Nous appellerons :

[H] la concentration en ions H^+

c la concentration totale en ion Fe^{3+}

M la concentration en métal libre

$\alpha = M/c$ fraction non hydrolysée de l'ion ferrique.

Le potentiel E_a de l'équation (38) est égal aux valeurs de E, lorsque le pH est bas, l'hydrolyse est alors très faible. Ceci sera vrai pour $c < 10^{-2}$M mais non pour la courbe $c = 5 \cdot 10^{-2}$M. Nous prendrons alors pour E_a la moyenne des potentiels normaux d'oxydo-réduction obtenus pour les autres valeurs de c. Ces différents potentiels étant très voisins, l'erreur commise est négligeable.

(39) Les équilibres suivent l'équation générale

$$p\ Fe^{3+} + q\ H_2O \rightleftharpoons Fe_p\ (OH)_q^{(3p-q)+} + q\ H^+$$

d'après la loi d'action de masse

$$\beta_{pq} = \frac{[H]^q \cdot [Fe_p\ (OH)_q^{(3p-q)+}]}{M^p} \qquad (40)$$

β_{pq} est la constante « globale » du complexe $Fe_p\ (OH)_q^{(3p-q)+}$.

Les équations des bilans donnent :

$$c = M + \sum_{pq} p \cdot \beta_{pq} \cdot M^p \cdot [H]^{-q} \qquad (41)$$

Source : MNHN, Paris

qui se transforme en :

$$[H]\cdot(c-M)/M=[H]\,(1/\alpha-1)=[H]\cdot b=\sum_{pq} p\cdot\beta^{pq}\cdot M^{p-1}\cdot[H]^{1-q} \tag{42}$$

$$b=1/\alpha-1 \tag{43}$$

Dans le cas de la formation de complexes polynucléaires, la courbe expérimentale $\alpha=f(\mathrm{pH})$ varie avec c et la fonction $[H]\cdot b$ est un polynôme en M pour une valeur de [H] fixée. Si $p=2$ l'équation (42) devient :

$$b[H]=\beta_{11}+\beta_{13}[H]^{-1}+\beta_{12}[H]^{-2}+\ldots$$
$$+2M(\beta_{21}+\beta_{22}[H]^{-1}+\beta_{23}[H]^{-2}+\ldots) \tag{44}$$

ainsi, lorsque [H] prend une valeur déterminée, la fonction [H] b est linéaire par rapport à M.

Les constantes d'hydrolyse peuvent être calculées à partir des pentes et ordonnées à l'origine, obtenues pour [H] fixée. Inversement, grâce à la connaissance des différentes constantes, on peut retrouver les courbes $\alpha=f(\mathrm{pH})$.

3.3 Méthodes de calcul utilisées pour l'étude des complexes de l'ion Fe^{3+} et des nucléotides en milieu acide.

3.3.1 *Détermination des constantes d'acidité des nucléotides.*

Les données de la littérature étant insuffisantes, nous avons calculé les différentes constantes d'acidité des désoxyribonucléotides, ces valeurs nous étant indispensables pour obtenir les constantes de stabilité des complexes formés avec l'ion ferrique.

Nous avons titré des solutions de désoxyribonucléotides 10^{-2}M, en milieu ClO_4^- 10^{-1}M, par NaOH 3 M.

Pour déduire les différents pK_a des mesures prédédentes, nous avons appliqué la méthode de Bjerrum (69). Elle est très classique, si bien que nous n'en expliciterons que les éléments essentiels.

Si l'on se trouve en présence d'une série de complexes successifs analogues à ceux définis au § 2.1, Bjerrum introduit le nombre de formation $\bar{n}$, qui représente la moyenne des molécules de l'agent complexant A, fixées sur chaque atome métallique M.

$$\bar{n}=\frac{[MA]+2[MA_2]+\ldots+N[MA_N]}{[M]+[MA]+\ldots+[MA_N]}$$

en évaluant [MA], $[MA_2]$, $\cdots$ $[MA^c]$, en fonction des constantes successives de formation K_1, K_2, $\cdots$ K_n, on peut écrire :

$$\bar{n}=\frac{K_1[A]+2K_1K_2[A]^2+\ldots+NK_1K_2\ldots K_n[A]^n}{1+K_1[A]+K_1K_2[A]^2+\ldots+K_1K_2\ldots K_n[A]^n}.$$

Source : MNHN, Paris

En portant $\bar{n}$ en fonction de pA on obtient la courbe de formation du système.

Les logarithmes des différentes constantes K_1, K_2 ... K_n sont égaux aux valeurs de pA pour lesquelles $\bar{n}$ vaut un demi-entier. En effet, lorsque le complexe MA est à moitié formé, $[MA]/[M] = 1$ et $K_1 = 1/[A]$ d'où $\log K_1 = p$A, et ainsi de suite.

Cette méthode est directement applicable aux polyacides. Ce sont en effet des complexes successifs, AH, AH_2 ··· etc., formés entre l'agent complexant H et l'atome central A.

Dans le cas d'un diacide, les équilibres sont les suivants :

$$H^+ + A^{--} \rightleftharpoons HA^-$$

$$HA^- + H^+ \rightleftharpoons H_2A$$

$$\frac{[HA^-]}{[H]\cdot[A^{--}]} = \frac{1}{K_{a_2}} = K_1 ; \quad \frac{[H_2A]}{[H]\cdot[AH^-]} = \frac{1}{K_{a_1}} = K_2$$

par suite, la fonction de formation $\bar{n} = f$ (pA) nous donne pK_{a_2} et pK_{a_1} pour les valeurs de $\bar{n}$ égales à 1,5 et à 0,5.

L'acide désoxyadénylique, comme l'acide désoxycytidylique, possède deux acidités phosphoriques et un groupement amino. La molécule, entièrement hydrogénée, se comporte comme un triacide puisqu'elle libère trois protons au cours de la titration. L'acide désoxyguanylique, qui porte en outre un groupement OH, est un tétracide. L'acide thymidylique n'a par contre pas de groupement amino, c'est un triacide. Hurst (70) a donné des valeurs approchées des différents pK_a de ces groupements.

Nous n'expliciterons que pour l'acide désoxyadénylique la manière dont il est possible de déduire des mesures de pH le nombre moyen de formation $\bar{n}$.

La fonction amino de ce composé perd son proton avant la deuxième acidité phosphorique. Les différentes formes sous lesquelles se présente ce triacide sont les suivantes, par ordre de pH croissant :

$$NH_3^+ R\,PO_2H_2 ; \quad NH_2 R\,PO_2H ; \quad NH_2 R\,PO_2H^- ; \quad NH_2 R\,PO^{--}_2$$

La solution de départ contient une certaine quantité d'acide perchlorique $[ClO_4^-]$. Nous appellerons P_o la concentration totale en nucléotide. Le nombre moyen de formation s'écrit :

$$(I) \qquad \bar{n} = \frac{3[NH_3^+ R\,PO_2H_2] + 2[NH_2 R\,PO_2H] + [NH_2 R\,PO_2H^-]}{P_o}$$

Nous avons introduit l'acide désoxyadénylique sous la forme d'un sel disodique, il existe donc, au début de la titration, une quantité d'ions sodium $[Na_o] = 2\,P_o$.

Source : MNHN, Paris

Si nous écrivons les bilans des charges :

$$(2)\quad [NH_3^+\,R\,PO_3\,H_2] + [Na_0^+] + [Na^+] + [H^+] = [ClO_4^-] + [NH_2\,R\,PO_3\,H^-] + 2\,[NH_2\,R\,PO^{2}{}_3^-] + [OH^-]$$

$[Na^+]$ représente la quantité de NaOH ajoutée,

$[H^+]$ est mesurée à l'électrode de verre.

Si, dans les deux membres de l'équation précédente, nous ajoutons la quantité :

$$2\,[NH_3^+\,R\,PO_3\,H_2] + [NH_2\,R\,PO_3\,H^-] + 2\,[NH_2\,R\,PO_3\,H],$$

$$(3)\quad \bar{n}\,P_x + [Na_0^+] + [Na^+] + [H^+] = [ClO_4^-] + [OH^-] + 2\,P_x$$

car

$$P_x = [NH_3^+\,R\,PO_3\,H_2] + [NH_2\,R\,PO_3\,H] + [NH_2\,R\,PO_3\,H^-] + [NH_2\,R\,PO^{2}{}_3^-]$$

comme $[Na_0^+] = 2\,P_x$

nous en déduisons immédiatement que

$$(4)\quad \bar{n} = \frac{[ClO_4^-] - [Na^+] - [H^+] + [OH^-]}{P_x}$$

en portant $\bar{n}$ en fonction du pH, nous obtenons la fonction de formation des trois acidités. Les valeurs du pH pour lesquelles $\bar{n}$ est égal à 0,5, 1,5 et 2,5 donnent pK_{a_3}, pK_{a_2} et pK_{a_1}.

Les résultats seront présentés au chapitre IV.

3.3.2 *Calcul des constantes de stabilité des complexes Fe^{3+} — désoxyribonucléotides.*

Par des mesures analogues à celles qui nous ont servi pour les constantes d'hydrolyse du fer et pour la même force ionique (10^{-1}M), nous avons déterminé $[Fe^{3+}]$, en fonction du pH et en présence de nucléotides. Nous avons tracé des courbes $\alpha = f(pH)$ semblables à celles décrites au § 3.2.

Nous avons supposé que l'ion ferrique se fixe sur une seule molécule de désoxyribonucléotide, au niveau des groupements phosphates et que la nature des complexes varie avec le pH. H. Galal-Gorchev et W. Stumm (71), en étudiant la fixation de l'ion ferrique sur l'acide orthophosphorique, ont, en effet, mis en évidence la formation des complexes $FeH_2PO_4^{2+}$ et $FeHPO_4^+$. Ils ont noté que la fixation de l'ion ferreux est négligeable pour les pH acides et que les résultats potentiométriques et spectrophotométriques sont identiques. Nous admettrons que, de même, la concentration en Fe^{3+} ne varie pas.

Dans ce qui suit nous appellerons :

Fe_t la concentration totale en fer;

Fe_h la concentration en fer hydrolysé;

Fe_c la concentration en fer complexé;

Source : MNHN, Paris

Fe la concentration en fer libre;
[H] la concentration en ion H^+;
P_0 la concentration totale en nucléotide;
P la concentration en nucléotide libre;
P_e la concentration en nucléotide sous forme de complexes.

Les résultats expérimentaux peuvent être interprétés d'après les équilibres suivants :

(5) $Fe^{3+} + [NH_3{}^+ R PO_3H_2] \rightleftharpoons [NH_3 R PO_3 HFe]^{3+} + H^+$

(6) $Fe^{3+} + [NH_3{}^+ R PO_3H_2] \rightleftharpoons [NH_3 R PO_3 HFe]^{3+} + 2H^+$

(7) $Fe^{3+} + [NH_3{}^+ R PO_3H_2] \rightleftharpoons [NH_3 R PO_3 Fe]^{+} + 3H^+$

Les constantes de stabilité s'écrivent :

(8) $$\chi_1 = \frac{[NH_3 R PO_3 HFe] \cdot [H]}{[NH_3{}^+ R PO_3H_2] \cdot Fe}$$

(9) $$\chi_2 = \frac{[NH_3 R PO_3 HFe] \cdot [H]^2}{[NH_3{}^+ R PO_3H_2] \quad Fe}$$

(10) $$\chi_3 = \frac{[NH_3 R PO_3 Fe] \cdot [H]^3}{[NH_3{}^+ R PO_3 H_2] \quad Fe}$$

soit, en faisant intervenir les formes ionisées des nucléotides et les constantes de stabilité correspondantes K_1, K_2, K_3,

(11) $Fe^{3+} + [NH_3 R PO_3H] \rightleftharpoons [NH_3 R PO_3 HFe]^{3+}$; K_1

(12) $Fe^{3+} + [NH_3 R PO_3H] \rightleftharpoons [NH_3 R PO_3 HFe]^{3+}$; K_2

(13) $Fe^{3+} + [NH_3 R PO_3{}^{2-}] \rightleftharpoons [NH_3 R PO_3 HFe]^{+}$; K_3

il découle immédiatement des valeurs des constantes d'acidité que :

$$K_1 = \frac{\chi_1}{K_{a_1}} ; \quad K_2 = \frac{\chi_2}{K_{a_1} K_{a_2}} ; \quad K_3 = \frac{\chi_3}{K_{a_1} K_{a_2} K_{a_3}}$$

Les constantes K_1, K_2 et K_3 sont directement représentatives des complexes formés. Dans le cas de l'acide thymidylique, le groupement amino n'existe pas; les équations précédentes sont facilement modifiées en tenant compte de deux constantes K_1 et K_2 mises en jeu par les deux acidités phosphoriques. Les groupements OH de la guanine et de la thymine sont sans action sur les équilibres en milieu acide, leur pK_a étant supérieur à 9.

Source - MNHN, Paris

Nous devons introduire une correction due aux produits d'hydrolyse de l'ion ferrique. Les résultats, explicités au chapitre IV, permettent de faire intervenir quatre constantes d'hydrolyse répondant à l'équation :

$$(14)\quad Fe_h = Fe\,.\left(\beta_{11}[H]^{-1} + \beta_{12}[H]^{-2} + 2\,Fe\cdot(\beta_{21}[H]^{-1} + \beta_{22}[H]^{-2})\right)$$

Si nous écrivons les bilans des concentrations :

$$(15)\quad P_o = P + P_c$$

$$(16)\quad Fe_o = Fe + Fe_h + Fe_c$$

(17) $P_c = Fe_c$ puisque, par hypothèse, dans les composés formés, le rapport $Fe/P = 1$. Si nous transformons P et Fe_c en fonction de $[NH_3^+ R PO_3H_2]$ et des constantes χ_1, χ_2, χ_3, K_{a_1}, K_{a_2} et K_{a_3}, nous pouvons écrire :

$$(18)\quad P = [NH_3^+ R PO_3H_2]\cdot\left(1 + \frac{K_{a_1}}{[H]} + \frac{K_{a_1}K_{a_2}}{[H]^2} + \frac{K_{a_1}K_{a_2}K_{a_3}}{[H]^3}\right)$$

$$(19)\quad Fe_c = [NH_3^+ R PO_3H_2]\cdot Fe\cdot\left(\frac{\chi_1}{[H]} + \frac{\chi_2}{[H]^2} + \frac{\chi_3}{[H]^3}\right)$$

d'après (15), (16) et (17).

$$(20)\quad Fe_c = P_c = Fe_o - Fe - Fe_h$$

$$(21)\quad P = P_o - P_c = P_o - (Fe_o - Fe - Fe_h)$$

(18) et (21) se transforment en :

$$(22)\quad P_o - (Fe_o - Fe - Fe_h) = [NH_3^+ R PO_3H_2]\cdot\left(1 + \frac{K_{a_1}}{[H]} + \frac{K_{a_1}K_{a_2}}{[H]^2} + \frac{K_{a_1}K_{a_2}K_{a_3}}{[H]^3}\right)$$

et (19) et (20) en :

$$(23)\quad (Fe_o - Fe - Fe_h) = [NH_3^+ R PO_3H_2]\cdot Fe\cdot\left(\frac{\chi_1}{[H]} + \frac{\chi_2}{[H]^2} + \frac{\chi_3}{[H]^3}\right)$$

en introduisant B (Fe, H)

$$(24)\quad B(Fe, H) = \frac{1}{\left(1 + \frac{K_{a_1}}{[H]} + \frac{K_{a_1}K_{a_2}}{[H]^2} + \frac{K_{a_1}K_{a_2}K_{a_3}}{[H]^3}\right)} = \frac{P_s}{(Fe_o - Fe - Fe_h)}$$

et A (Fe, H)

$$(25)\quad A(Fe, H) = \frac{(Fe_o - Fe - Fe_h)}{Fe} = \left(\frac{1}{\alpha} - 1 - \frac{Fe_h}{Fe}\right)$$

Les équations (22), (23), (24) et (25), en définitive, donnent :

$$(26)\quad f(Fe, H) = \chi_1[H]^{-1} + \chi_2[H]^{-2} + \chi_3[H]^{-3} = \frac{A(Fe, H)}{B(Fe, H)}$$

Source : MNHN, Paris

B (Fe, H) et A (Fe, H) sont tirées des résultats expérimentaux et font intervenir les constantes d'hydrolyse du fer et les constantes d'acidité des nucléotides.

f (H, Fe) est donc une fonction qui doit être un polynôme d'ordre trois en $[H]^{-1}$, pour que les hypothèses initiales soient vérifiées. Si l'on porte les valeurs de $(f(H, Fe).[H])$ en fonction de $[H]^{-1}$, l'intersection de la courbe obtenue avec l'axe des ordonnées détermine la valeur de χ_1. Si les hypothèses de départ sont convenables, la fonction :

$$g([H]^{-1}) = (f(H, Fe) \cdot [H] - \chi_1) \cdot [H]$$

doit être une droite dont l'ordonnée à l'origine et la pente sont respectivement χ_2 et χ_3.

Inversement, s'il existe des valeurs, pour χ_1, χ_2 et χ_3, telles que le polynôme $\chi_1 [H]^{-1} + \chi_2 [H]^{-2} + \chi_3 [H]^{-3}$ décrive convenablement les variations de $\frac{B (Fe, H)}{A (Fe, H)}$, les équations (24) et (25) permettront de calculer des valeurs de α qui seront en bon accord avec les mesures.

Nous présenterons au Chapitre IV les résultats de cette étude.

Source : MNHN, Paris

CHAPITRE III

COMPLEXATION DE L'ION CUIVRIQUE

I. — INTRODUCTION

La fixation de l'ion Cu^{2+} sur les bases et les nucléosides a été étudiée par un certain nombre d'auteurs (73) (77). Les résultats obtenus mettent en évidence l'importance de la fixation sur l'azote 7 des bases puriques. La complexation par les adénosine mono-, di- et triphosphates (78), (79), (23) se fait surtout au niveau des phosphates.

D'après leurs mesures magnétiques sur les complexes de l'ion Cu^{2+} avec les acides nucléiques, EISINGER et coll. (44), (80), WALSH et coll. (45) et MALING et coll. (23), ont admis que l'ion cuivrique se fixe essentiellement sur les phosphates. Ces résultats seraient confirmés par la tendance, présentée par les acides nucléiques, à former des agrégats en solution en présence d'ion cuivrique, signalée par ZUBAY et DOTY (81) ainsi que par YAMANE et DAVIDSON (37). FRIEDEN et ALLES (73), en étudiant l'action inhibitrice des acides nucléiques et de leurs monomères sur la catalyse exercée par l'ion cuivrique au cours de l'oxydation de l'acide ascorbique, ont établi, à pH 7,2, un ordre de stabilité croissante pour les complexes formés :

adénine > guanine > d GMP > ADN > d AMP > désoxyguanosine > désoxy-adénosine.

Nous avons essayé d'élucider les mécanismes de fixation de l'ion cuivrique sur l'ADN, les travaux précédents ne concordant pas toujours. Il était, en particulier, difficile de conclure avec certitude à l'unique fixation du cuivre sur les phosphates, la stabilité des complexes avec les bases puriques rendant possible l'existence de complexes « internes ».

1.1 Matériel et méthodes.

1° L'ADN est préparé à partir de thymus de veau par la méthode de Kay, Simmons et Dounce. Il nous a été fourni par le Centre de Recherches sur les Macromolécules de Strasbourg. Ses caractéristiques sont les suivantes :

N° réf.	* ε_p à 260 mμ	M	Teneur en protéines (en poids)
V 220	6 400	$4 \cdot 10^6$	0,18 %
V 247	6 050	$6{,}5 \cdot 10^6$	0,10 %
V 251	6 200	$2{,}5 \cdot 10^6$	—
V 253 B	6 050	—	—
V 268	6 050	—	—

* ε_p représente le coefficient moléculaire d'absorption, rapporté au nombre de nucléotides, mesuré à $\lambda = 260$ mμ.

Source : MNHN, Paris

Les échantillons V 247 et V 253 B ont été traités à l'hydroxy-8 quinoléine, au cours de leur préparation, dans le but d'éliminer les ions de transition, conformément à la méthode de MALING et coll. (23). Cependant, ces ions n'ont pas été totalement extraits car les échantillons présentent un signal de RPE résiduel, fait en accord avec les résultats de BLOIS et coll. (22). Ce signal, apparent sur l'échantillon solide, est négligeable en solution et on ne note aucune différence significative entre les divers échantillons.

2° Les nucléosides et nucléotides (5' phosphates) proviennent de Mann Research Laboratories, New York; Sigma Chemical Company, St-Louis, Missouri; Cal. Biochem. A. G. Lucerne; ils sont chromatographiquement purs.

3° Les mesures ont été faites dans les cellules à solution aqueuse. La méthode a été décrite au chapitre II.

4° La force ionique est maintenue constante par du $NaClO_4$, l'anion ClO_4^- n'ayant qu'une très faible action complexante sur le cuivre. Le pH est ajusté par des solutions d'acide ou de base à l'aide d'une microseringue. La température est maintenue à 22° ± 3°C pour tous les spectres.

5° Préparation des solutions :

Les solutions de nucléosides et nucléotides sont dosées par spectrophotométrie UV, à l'aide des coefficients d'absorption moléculaire donnés par VOET et coll. (82).

Les solutions de cuivre sont préparées à partir de sulfate à $5\,H_2O$ Merck, par pesée directe. L'ion SO_4^{--} a une influence négligeable sur la complexation, aux concentrations choisies.

Dans le cas de l'ADN, on travaille sur des solutions contenant environ 300 mg par 100 ml. Leur dosage se fait par spectrophotométrie UV, à partir des ε moléculaires donnés avec les échantillons.

Les mélanges ADN-cuivre s'effectuent de la manière suivante : primitivement préparées en dialysant les solutions d'ADN contre une solution de cuivre, nous avons pu constater que les résultats n'étaient pas modifiés si les solutions sont faites par mélange direct.

Nous avons aussi été amenés à étudier un polyphosphate de sodium (sel de Graham) dont la masse moléculaire a été déterminée par diffusion de la lumière.

1.2 Études préliminaires.

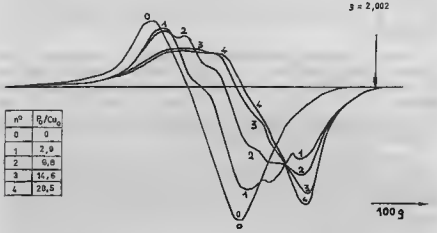
Dans une série de mesures préliminaires, nous nous sommes attachés à trouver les conditions optimales d'étude par RPE des complexes ADN-cuivre.

1.2.1 *Influence de la concentration en ADN.*

Pour une force ionique 10^{-2}M, une concentration totale en cuivre et un volume final fixés, nous avons ajouté des quantités croissantes d'ADN de façon à faire varier le rapport P_t/Cu_t qui représente le nombre de nucléotides susceptibles de réagir avec un ion cuivrique. Les spectres sont représentés sur la figure 12. Ils subissent des variations continues en intensité

Source : MNHN, Paris

et en position, traduisant une complexation croissant avec P_g/Cu_g. Ils se rapprochent en effet progressivement de $g = 2$ (cf. chapitre II). En supposant que nous sommes en présence de plusieurs composés et que les enregistrements sont la résultante de toutes les absorptions spécifiques, nous avons décomposé graphiquement ces spectres.



n°	P_g/Cu_g
0	0
1	2,9
2	6,8
3	14,6
4	20,5

FIG. 12. — Influence de la concentration en ADN ($NaClO_4$ 10^{-4} M).

Ils apparaissent tous comme la superposition de trois signaux élémentaires dont les intensités relatives varient avec P_g/Cu_g. Sur la figure 13 nous avons représenté une telle décomposition, effectuée pour un rapport $P_g/Cu_g = 14,6$. Nous donnons ici les résultats sous forme de courbes intégrales pour simplifier la figure.

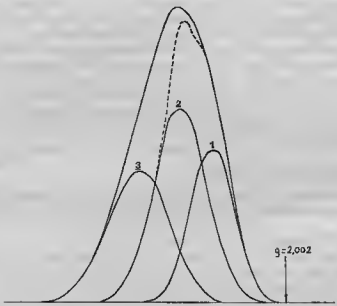


FIG. 13. — Décomposition du spectre $P_g/Cu_g = 14,6$.

Source : MNHN, Paris

1° L'un, ③, possède le même facteur de Landé que le cuivre ionique. Les expériences de dialyse nous ont indiqué que, dans le dialysat, le cuivre ionique n'est pas détecté par colorimétrie au 2,2'-diquinolyle (sensibilité 0,010 µg/ml à 546 mµ) (83); on peut cependant avancer que le signal ③ est dû au cuivre ionique. En effet, les caractéristiques magnétiques ne sont pas notablement modifiées, par rapport à un signal de référence. Le cuivre se trouve vraisemblablement maintenu au voisinage de la macromolécule par des interactions électrostatiques avec les charges négatives des groupements phosphates ionisés.

2° Le signal ② possède un facteur de Landé voisin de $g = 2{,}138$. Les facteurs g de solutions contenant du cuivre, des phosphates et polyphosphates ont pour valeur 2,140 pour les premiers et sont compris entre 2,147 et 2,155 pour les seconds. Dans ce dernier cas, il y aurait plusieurs composés en présence. D'après ces résultats, le signal ② serait attribué à un complexe cuivre-phosphate.

3° Le signal, ①, dont le facteur $g = 2{,}092$ est le plus proche de $g = 2$, indique qu'il existe un autre type de complexe. La stabilité de ce dernier est supérieure à celle du complexe cuivre-phosphate. Nous le désignerons provisoirement par Cu_s.

1.2.2 *Influence du pH.*

Les mesures indiquent que la complexation du cuivre par l'ADN varie avec le pH.

Pour des pH de 4 à 6, la concentration en Cu_s augmente légèrement au détriment du cuivre ionique et du complexe cuivre-phosphate. A partir de pH 6, l'hydroxyde Cu (OH)$_2$ précipite, le nombre de centres paramagnétiques diminue et par suite le rapport P_s/Cu_s augmente. Il s'ensuit une diminution de l'intensité du signal et un glissement des courbes vers $g = 2$, traduisant l'augmentation relative de la concentration en complexe Cu_s (fig. 14). Par ailleurs, compte tenu que l'ADN subit une dégradation aux

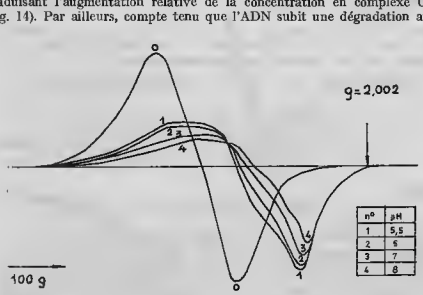


FIG. 14. — Influence du pH ($NaClO_4$ 10^{-1} M; $P_s/Cu_s = 14{,}6$; n° 0 = Cuivre de référence).

Source - MNHN, Paris

pH inférieurs à 4 ou supérieurs à 10 (ces valeurs dépendent de la force ionique), dans tout ce qui suit, les mesures seront effectuées à pH 5,5, valeur optimale pour la complexation du cuivre.

D'après cet ensemble de résultats, nous nous trouvons en présence de composés en équilibre chimique dont les proportions varient avec les conditions de milieu.

Nos expériences, relatives à la fixation de l'ion cuivrique sur les nucléosides et les nucléotides dérivés de l'ADN, nous amèneront à déterminer la nature la plus probable du complexe Cu_4, dont nous étudierons ensuite, sur l'ADN, les caractéristiques.

Nous n'avons pas abordé le problème de la fixation du cuivre sur les bases, les travaux antérieurs ayant mis en évidence le rôle primordial de l'azote 7 des bases puriques; la complexation s'accompagne d'une migration du proton fixé sur l'azote 9, mais ce mécanisme ne peut intervenir dans le cas des nucléosides, nucléotides et ADN puisque l'azote 9 est occupé par la liaison base-sucre. Le phénomène observé est donc différent de celui qui se produit avec les bases seules.

II. — RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

2.1 Fixation de l'ion cuivrique sur les désoxyribonucléosides.

2.1.1 *Cas général.*

Pour déterminer, qualitativement, la stabilité des complexes cuivre-désoxyribonucléosides, nous avons comparé les spectres enregistrés dans des conditions identiques pour les quatre nucléosides.

A une solution $8 \cdot 10^{-4}$M en ion cuivrique, nous avons ajouté des désoxyribonucléosides de sorte que la concentration soit $1{,}3 \cdot 10^{-3}$M; le pH reste fixé à 5,5. Les spectres sont représentés sur la figure 15. Le signal du cuivre ionique de référence n'est pas sensiblement modifié par l'introduction de thymidine. Nous pouvons en conclure que l'ordre de stabilité croissant des complexes désoxyribonucléosides-cuivre est le suivant :

désoxyguanosine > désoxycytidine > désoxyadénosine ≫ thymidine.

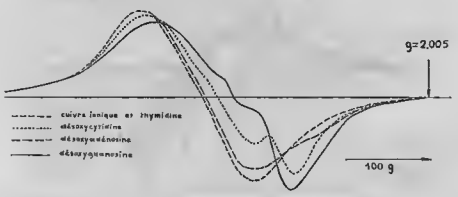


FIG. 15. — Spectres des complexes Cu-nucléosides (pH 5,5).

Source MNHN, Paris

2.1.2 *Complexes cuivre-désoxyguanosine.*

Pour préciser les résultats précédents, nous avons étudié plus particulièrement le système cuivre-désoxyguanosine, ce dernier composé étant le plus actif pour la complexation du cuivre. Dans une série de solutions (numérotées de 1 à 8), la quantité de cuivre est $8 \cdot 10^{-4}$M. Nous avons ajouté des quantités croissantes d'une solution de désoxyguanosine $7{,}35 \cdot 10^{-2}$M. Pour la solution portant le numéro n, cette concentration est égale à $n \times 7{,}35 \cdot 10^{-4}$M. Le volume final est maintenu constant. Le pH est fixé à 5,5. Les spectres de RPE, corrigés comme nous l'avons indiqué au chapitre II, sont représentés sur la figure 16. Nous avons mesuré les variations de l'intensité h pour $g = 2{,}147$. Pour étudier ces variations, nous pouvons admettre que seuls sont en présence, le cuivre ionique, le complexe 1-1 et le complexe 1-2, caractérisés par des coefficients moléculaires de résonance (cf. chapitre II), que nous appellerons respectivement ε_0, ε_1 et ε_2 et par les constantes de stabilité β_1 et β_2. Au pH choisi, il ne se forme pas d'hydroxo-complexes. Nous pouvons donc appliquer la méthode des approximations successives et les équations définies au chapitre II paragraphe 2.2.2. Il est possible de calculer des valeurs convenables pour ε_1, ε_2, β_1 et β_2, ce qui justifie les hypothèses précédentes. Les valeurs moyennes sont :

$$\varepsilon_0 = 6{,}4 \cdot 10^4 \; ; \qquad \varepsilon_1 = 4{,}3 \cdot 10^4 \; ; \qquad \varepsilon_2 = 1{,}9 \cdot 10^4 \; ;$$
$$\beta_1 = 8{,}1 \cdot 10^3 \mathrm{M}^{-1} \; ; \qquad \beta_2 = 3{,}8 \cdot 10^6 \mathrm{M}^{-2} \; ;$$

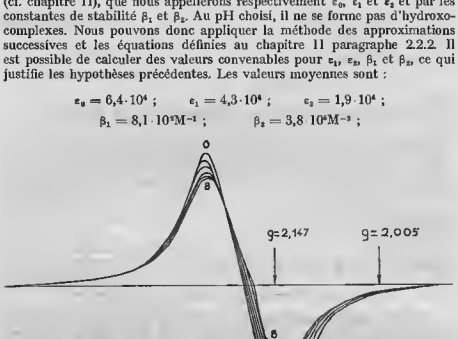


FIG. 16. — Spectres des complexes Cu-désoxyguanosine.

ε_0 est donné par le signal du cuivre ionique seul en mesurant l'intensité h_0 pour $g = 2{,}147$ et en connaissant la concentration du métal : $h_0 = \varepsilon_0 \times 8 \cdot 10^{-4}$. En tenant compte de la remarque faite au chapitre II, paragraphe 1.2.5, ceci permet en outre de déterminer le facteur multiplicatif nécessaire, pour utiliser les valeurs des ε précédents, lors de conditions d'enregistrement différentes des nôtres.

Source : MNHN, Paris

Sur la figure 17, nous avons représenté l'intensité H_n, relative au cuivre ionique total, pour le facteur $g = 2{,}147$, ainsi que la courbe calculée à partir des valeurs précédentes. L'écart moyen est de 1,6 %.

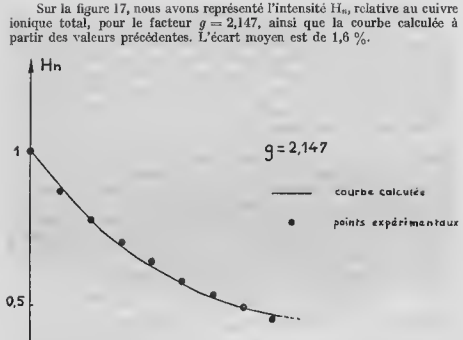


FIG. 17. — Intensité relative des complexes Cu-désoxyguanosine.

Par décomposition graphique des spectres de la figure 16, nous avons pu vérifier que la surface du signal spécifique de chaque espèce est sensiblement proportionnelle à la concentration théorique. Sur la figure 18, nous avons représenté les courbes intégrales de la décomposition effectuée dans le cas où $n = 8$. Les concentrations sont les suivantes :

$$[\text{Cu}] = 0{,}61 \cdot 10^{-4}\,\text{M} \; ; \qquad [\text{complexe 1–1}] = 2{,}31 \cdot 10^{-4}\,\text{M} \; ;$$

$$[\text{complexe 1–2}] = 5{,}08 \cdot 10^{-4}\,\text{M}.$$

Les facteurs de Landé ont pour valeur $g_1 = 2{,}19$ et $g_2 = 2{,}14$. Ils sont déduits d'une décomposition graphique, de sorte que la précision obtenue est assez faible. Il est cependant possible de vérifier que le complexe le plus stable possède le facteur de Landé le plus proche de $g = 2$. La largeur des raies à mi-hauteur est aussi conforme aux règles définies au chapitre II.

Source : MNHN, Paris

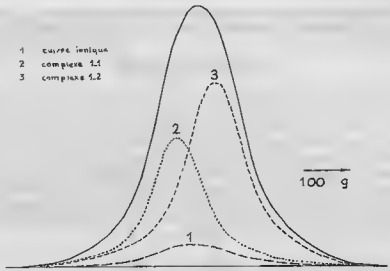


FIG. 18. — Décomposition du spectre n° 8 du système Cu-désoxyguanosine.

2.2 Fixation de l'ion cuivrique sur les désoxyribonucléotides.

Lors de cette étude, les conditions expérimentales sont sensiblement les mêmes que celles mentionnées au paragraphe 2.1, pour établir une comparaison entre nucléosides et nucléotides. Nous avons cependant utilisé une concentration en nucléotides égale à $6{,}5 \cdot 10^{-3}$M, au lieu de $1{,}3 \cdot 10^{-2}$M précédemment. Le pH est de 5,5.

REMARQUE : Nous n'avons pas étudié le cas de l'acide thymidylique qui se présentait sous la forme d'un sel d'ammonium. Les résultats sur les nucléosides laissent supposer une faible complexation, conformément aux résultats de FRIEDEN et ALLES (73); il ne nous a pas semblé utile d'approfondir ce problème.

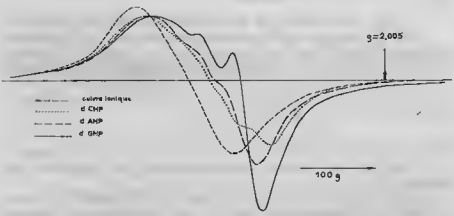


FIG. 19. — Spectres des complexes Cu-nucléotides.

Source : MNHN, Paris

Les spectres sont représentés sur la figure 19. Nous pouvons en déduire que l'ordre de stabilité croissante pour les complexes formés avec les nucléotides est le suivant :

$$d\,GMP > d\,AMP > d\,CMP$$

Les résultats sur les bases, indiqués dans la littérature et ceux présentés ici, concordent pour démontrer que, de tous les dérivés nucléiques, le groupement guanine est le complexant le plus actif vis-à-vis du cuivre; ceci allant de pair avec l'augmentation du caractère basique de l'azote 7 de l'hétérocycle, lorsque l'on passe du nucléoside au nucléotide, puis au polymère correspondant. Nous pouvons donc admettre que le composé, que nous avons appelé Cu_s au paragraphe 1.2.1, est vraisemblablement formé par la fixation de l'ion cuivrique sur certains groupements guanine de l'ADN. Ce résultat est, d'ailleurs, en accord avec les prévisions théoriques développées par B. et A. Pullman (84).

2.3 Fixation de l'ion cuivrique sur l'ADN.

D'après ce qui précède, nous pouvons admettre que, lorsque l'ADN est en présence de cuivre, il s'établit certains équilibres cbimiques entre :

— du cuivre ionique, maintenu au voisinage des phosphates par des interactions électrostatiques,
— du cuivre Cu_p, fixé par covalence sur les groupements phospbates,
— du cuivre Cu_s, fixé sur un site interne que l'on peut identifier à des groupements guanine.

Nous nous attacherons, à présent, à la détermination de la formule des complexes cuivre-guanine et des constantes de stabilité des composés formés.

Pour ne pas modifier le nombre de sites, nous avons maintenu fixe la concentration en ADN et fait varier celle du cuivre. Pour cbaque échantillon, les résultats sont très reproductibles; par contre, la quantité de cuivre complexé varie avec chacun.

2.3.1. *Détermination des caractéristiques spectrales des complexes.*

Dans des solutions où la concentration en ADN est $4{,}125 \cdot 10^{-3}$M (exprimée en nucléotides), nous avons ajouté des quantités croissantes de cuivre de façon à faire varier linéairement le rapport P_n/Cu_s qui représente le nombre de nucléotides susceptibles de réagir avec nn ion cuivrique. Ce rapport varie de 13 à 2,2. Le pH est ajusté à 5,5. La force ionique est 10^{-2}M en $NaClO_4$. Pour la solution de numéro n :

$$[Cu_s]_n = 0{,}318 \cdot 10^{-3} \cdot n \cdot M$$

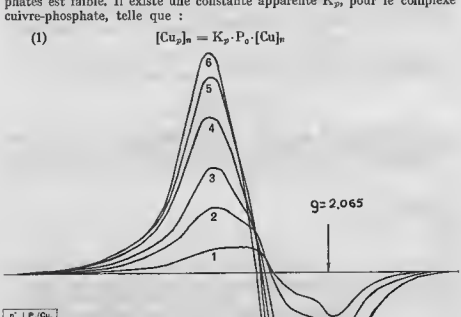
Sur la figure 20 nous avons représenté les spectres relatifs à l'ADN, référence V 251.

Pour leur analyse, nous avons tenu compte de la propriété d'additivité que nous avons mentionnée au cbapitre II. Nous avons étudié les variations de l'intensité mesurée pour $g = 2{,}065$.

Source MNHN, Paris

Nous avons pu constater que la proportion de cuivre fixé sur les phosphates est faible. Il existe une constante apparente K_p, pour le complexe cuivre-phosphate, telle que :

(1) $$[Cu_p]_n = K_p \cdot P_0 \cdot [Cu]_n$$



n°	P/Cu
6	2,21
5	2,63
4	3,38
3	4,46
2	6,64
1	13,3

FIG. 20. — Spectres des complexes Cu-ADN (V 251 natif)

Pour la solution de numéro n :

(2) $$h_n = \varepsilon_0 \cdot [Cu]_n + \varepsilon_1 \cdot [Cu_p]_n + \varepsilon_2 \cdot [Cu_s]_n$$

où ε_0, ε_1 et ε_2 sont les contributions moléculaires de résonance respectives des composés paramagnétiques en présence.

En outre :

(3) $$[Cu_0]_n = [Cu]_n + [Cu_p]_n + [Cu_s]_n$$

l'élimination de $[Cu]_n$, $[Cu_p]_n$ et $[Cu_s]_n$ dans (1), (2) et (3) conduit à une équation à trois inconnues ε_1, ε_2 et K_p.

Leurs valeurs moyennes sont tirées des n équations du système :

$$\varepsilon_2 = 8{,}2 \cdot 10^3 \; ; \qquad \varepsilon_1 = 20{,}0 \cdot 10^3 \; ; \qquad \varepsilon_0 = 88 \cdot 10^3$$
$$K_p = 37{,}5 \; M^{-1}$$

Source : MNHN, Paris

Pour chaque solution, il est donc possible de calculer toutes les concentrations des complexes sans faire d'hypothèses sur la nature de Cu_r.

2.3.2 *Détermination de la formule du complexe Cu_s et de sa constante de stabilité.*

D'après les résultats du chapitre II, § 2.2.1, dans l'hypothèse de la formation d'un complexe de formule 1-1, la fonction expérimentale

$$[Cu]_n = f\left(\frac{[Cu]_n}{[Cu_s]_n}\right)$$

est une droite dont la pente est égale au nombre de sites actifs S_n et l'ordonnée à l'origine à $-1/K_s$; (K_s: constante de stabilité du complexe Cu_s).

Cette fonction ne serait plus une droite si plusieurs complexes étaient

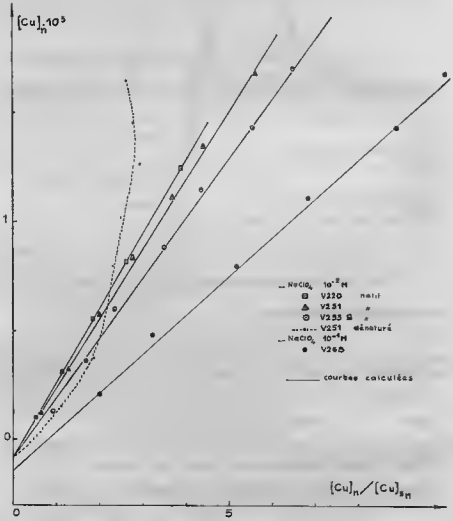
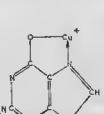


FIG. 21. — Fonction $[Cu]_n = f([Cu]_n/[Cu_s]_n)$ pour l'ADN.

Source : MNHN, Paris

en présence. La linéarité est une condition nécessaire et suffisante de vérification des hypothèses précédentes. Sur la figure 21, nous avons porté ces fonctions pour les échantillons V 220, V 251 et V 253 B. Aux erreurs d'expérience prés, ce sont des droites.

Nous pouvons en tirer les conclusions suivantes :



Formule I.

— Seul se forme le complexe 1-1 de formule (I).

— Toutes ces droites ont la même ordonnée à l'origine, ce qui confirme le mécanisme supposé précédemment.

Nous en déduisons que $K_s = 1{,}25 \cdot 10^4 \pm 0{,}02 \cdot 10^4\ M^{-1}$.

— La pente de ces droites, qui est égale au nombre de sites S_s, varie avec l'échantillon; les valeurs moyennes, rapportées au nombre total de nucléotides (S_s/P_s), sont respectivement égales à 7,9; 7,6 et 6,6 % pour les ADN V 220, V 251 et V 253B.

2.3.3 *Influence de la force ionique.*

Nous avons effectué les mêmes mesures dans le cas d'un ADN V 268, en fixant la force ionique par du $NaClO_4 \cdot 10^{-3}M$. La complexation du cuivre diminue, comme l'indique la figure 22 sur laquelle nous avons porté l'intensité h_n mesurée à $g = 2{,}065$ pour les forces ioniques $10^{-2}M$ et $10^{-1}M$.

La fonction expérimentale $[Cu]_n = f([Cu]_n/[Cu_t]_n)$ précédente reste une droite (fig. 21). Un rapport $S_s/P_s = 4{,}2$ % est tiré de la pente; l'ordonnée à l'origine nous donne : $K_s = 7{,}1 \cdot 10^3 \pm 0{,}1\ 10^3 M^{-1}$.

En outre, nous avons constaté que la concentration en complexe cuivre-phosphate devient négligeable pour cette force ionique.

Sur la figure 22, nous avons tracé les valeurs théoriques de h_n, déduites des résultats précédents, l'écart moyen est de 1,4 %. Il existe une relation linéaire, analogue à l'équation (2) du paragraphe 2.3.1, qui rend compte des variations de h_n pour $g = 2{,}257$. De nouveaux coefficients s'_0, s'_1 et s'_2 peuvent être calculés, à partir des concentrations des composés paramagnétiques. Ceci confirme la validité de notre méthode puisque les conclusions sont indépendantes de g.

Lorsque la force ionique est $10^{-2}M$, seule intervient la contribution du cuivre ionique, pour $g = 2{,}257$. La concentration en cuivre non complexé est directement proportionnelle à l'intensité h_n. Nous utiliserons ce résultat dans ce qui suit.

Source : MNHN, Paris

2.3.4. *Cas de l'ADN dénaturé.*

En opérant de la même manière, nous avons ensuite étudié la fixation du cuivre sur l'ADN « dénaturé » par chauffage, durant 15 minutes, au bain-marie à 100°. La solution est refroidie brusquement pour éviter une renaturation partielle.

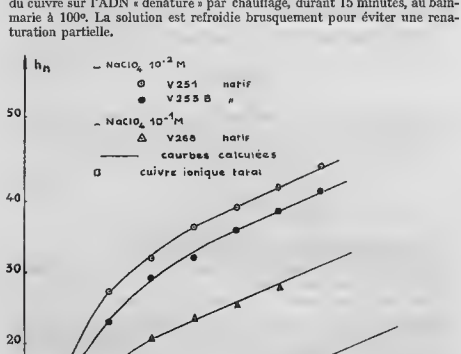


FIG. 22. — Intensité h_n pour les complexes Cu - ADN.

L'hyperchromie à 260 mμ varie de 25 à 28 %.

Sur la figure 23, sont représentés les spectres donnés par l'ADN V 251, la force ionique est 10^{-2}M en $NaClO_4$.

Ces courbes sont comparables à celles de la figure 20. Elles traduisent une modification très importante du phénomène, la proportion de cuivre fixé augmente considérablement et, pour des concentrations élevées en cuivre, des précipités peuvent se former. Un tel résultat avait été signalé dans le cas de l'ion Mg^{++} par ZUBAY et DOTY (81).

Les variations de h_n, mesurée à $g = 2{,}065$, conduisent à une fonction $[Cu]_n = f([Cu]_n/[Cu_t]_n)$ qui n'est plus une droite (cf. fig. 21). Les hypothèses antérieures ne sont plus suffisantes.

Source - MNHN, Paris

Nous en discuterons ultérieurement et nous tenterons de proposer un mode de fixation du cuivre sur l'ADN dénaturé.

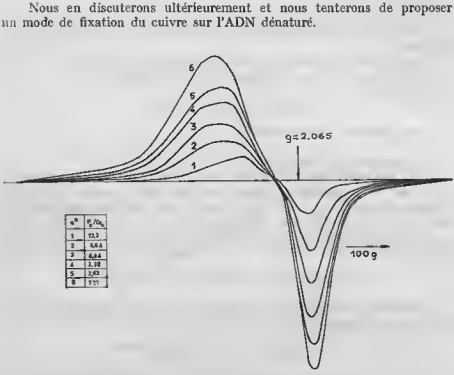


FIG. 23. — Spectres des complexes Cu-ADN (V 251 dénaturé).

2.4 Étude du système ternaire ADN-cuivre-Nitroso R.

Pour compléter les données précédentes, nous nous sommes attachés à élucider certains des mécanismes d'interactions entre les complexes ADN-cuivre et un agent chélatant. Cette étude peut aider à la compréhension de certains mécanismes biologiques (complexes enzymatiques en particulier).

Notre choix s'est porté sur le Nitroso R, dont les complexes cuivriques ont des propriétés optiques et magnétiques intéressantes, susceptibles de nous servir pour l'étude du système ternaire en question.

Nous n'avons pu noter de fixation directe du Nitroso R sur l'ADN, en l'absence d'ions Cu^{2+}. Nous admettrons donc qu'il n'y a pas d'interactions entre ces deux agents complexants, en solution.

2.4.1 *Système Nitroso R-cuivre.*

L'étude, optique et magnétique, des complexes du cuivre avec le Nitroso R a été faite au préalable, afin de déterminer les constantes de stabilité et les caractéristiques spectrales des composés formés.

La constante d'ionisation de la fonction chélatante « nitroso-naphtol » a été obtenue en titrant, par pH-métrie, une solution du réactif, à la force ionique 10^{-1}M. Le *p*Ka est de 7,06.

Source : MNHN, Paris

a) Mesures spectrophotométriques.

Nous avons tracé les spectres d'absorption, dans le visible, de solutions contenant :

— Concentration constante en cuivre total $[Cu_0] = 1 \cdot 10^{-2}$M,

— Concentration en agent complexant dans la solution n :

$$[N_2]_n = 0{,}385 \cdot 10^{-2} \cdot n \cdot M,$$

— Force ionique 10^{-1}M en $NaClO_4$.

Les spectres sont enregistrés à pH 3 et 5.

Les complexes sont de formule 1-1 et 1-2; dans cette zone de pH, il n'y a pas de complexes hydroxylés; les méthodes de calcul définies au chapitre II § 2.2.2 sont donc applicables. La méthode des approximations successives nous conduit aux résultats suivants. Pour la longueur d'onde $\lambda = 4830$ Å, les valeurs des coefficients moléculaires d'absorption sont respectivement, pour le Nitroso R, le complexe 1-1 et le complexe 1-2 :

$$\varepsilon_0 = 0{,}0245 \cdot 10^4 \; ; \quad \varepsilon_1 = 0{,}535 \cdot 10^4 \; ; \quad \varepsilon_2 = 1{,}14 \cdot 10^4.$$

Les constantes « globales » de stabilité (cf. chapitre II) des complexes 1-1 et 1-2 ont pour valeur :

$$\beta_1 = 3{,}0 \cdot 10^4 \ M^{-1} \; ; \quad \beta_2 = 3{,}42 \cdot 10^{14} \ M^{-2}.$$

Sur la figure 24, nous avons représenté les variations théoriques et expérimentales de la densité optique, à pH 3; l'écart moyen est de 1,1 %. Il en est de même à pH 5. Les valeurs précédentes conviennent donc.

Nous avons constaté, qu'à partir de pH 6, il se forme un complexe stable en milieu basique. Son influence est négligeable sur les équilibres chimiques intervenant à pH 5,5.

b) Mesures de RPE.

Nous avons préparé, pour cette étude, une série de solutions contenant :

cuivre total $[Cu_0] = 0{,}640 \cdot 10^{-2}$ M;
Nitroso R total $[N_2]_n = 0{,}190 \cdot 10^{-2}\,(1 + n)$ M ; (n varie de 0 à 7)
pour le pH 5,5 et la force ionique 10^{-1}M en $NaClO_4$.

Nous avons enregistré les spectres de RPE et les spectres optiques. La courbe des variations de la densité optique, obtenue à partir des valeurs du paragrapbe précédent, est toujours en bon accord avec les résultats expérimentaux.

Les spectres de RPE présentent tous un minimum prononcé pour le facteur $g = 2{,}076$.

A partir des concentrations calculées à l'aide des constantes d'équilibre précédentes, il est possible de déterminer les coefficients moléculaires de résonance ε'_0, ε'_1 et ε'_2 du cuivre ionique, du complexe 1-1 et du complexe 1-2. En effet :

$$h_n = \varepsilon'_0 \cdot [Cu]_n + \varepsilon'_1 \cdot [Cu\,N]_n + \varepsilon'_2 \cdot [Cu\,N_2]_n$$

Source : MNHN, Paris

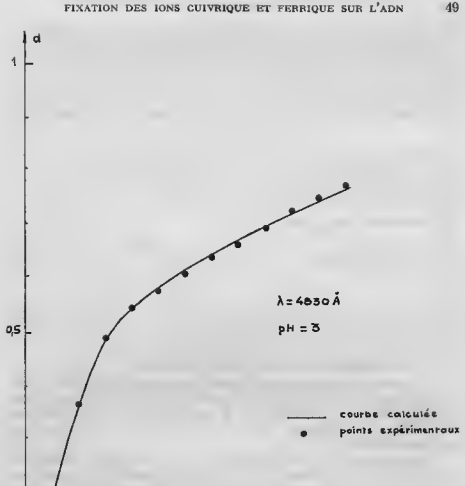


FIG. 24. — Densité optique des complexes Cu-Nitroso R.

en appelant Cu N et Cu N_2 les complexes 1-1 et 1-2.

Cette équation devient :

$$f = (h_n - \varepsilon'_0 \cdot [\mathrm{Cu}]_n)/[\mathrm{Cu\ N}]_n = \varepsilon'_1 + \varepsilon'_2 [\mathrm{Cu\ N_2}]_n/[\mathrm{Cu\ N}]_n.$$

Cette fonction expérimentale nous conduit à ε'_1 et ε'_2 (fig. 25). Le fait que, aux erreurs d'expérience près, nous obtenions une droite, confirme les hypothèses que nous avons faites sur la nature des composés en présence.

Source : MNHN, Paris

ε'_0, ε'_1 et ε'_2 ont respectivement pour valeur $0{,}55 \cdot 10^4$, $1{,}17 \cdot 10^5$ et $3{,}5 \cdot 10^5$ dans les conditions spécifiques d'enregistrement utilisées.

FIG. 25.

2.4.2 *Système ternaire ADN-cuivre-Nitroso R.*

A des solutions contenant les mêmes concentrations en cuivre et en Nitroso R que celles définies au paragraphe 2.4.1 b, nous avons ajouté des quantités d'ADN (V 268) telles que la concentration totale, exprimée en nucléotides, soit constante et égale à $4{,}25 \cdot 10^{-4}$M. Force ionique et pH ne sont pas modifiés.

Nous avons vu, aux paragraphes 2.3.2 et 2.3.3, que, dans ces conditions, le nombre de sites guanine de l'ADN, actifs vis-à-vis du cuivre, est $S_a = 0{,}180 \cdot 10^{-4}$ M. La constante de stabilité K, du complexe Cu, est égale à $7{,}1 \cdot 10^3\ M^{-1}$. L'interaction cuivre-phosphate est négligeable.

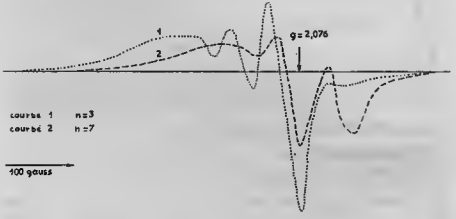


FIG. 26. — Spectres du système ADN-Cu-Nitroso R.

Source : MNHN, Paris

Les spectres de RPE présentent tous un minimum prononcé pour $g = 2{,}076$ (fig. 26); voir figure 27 les variations correspondantes de h_n. Le calcul nous montre que la contribution du complexe Cu, est négligeable.

Dans un premier stade, nous avons supposé que les équilibres chimiques sont déplacés, sans qu'apparaissent de composés nouveaux. Les constantes de stabilité et les concentrations totales en cuivre, Nitroso R et sites S_a étant connues, il est aisé, ainsi que nous l'avons indiqué au chapitre II,

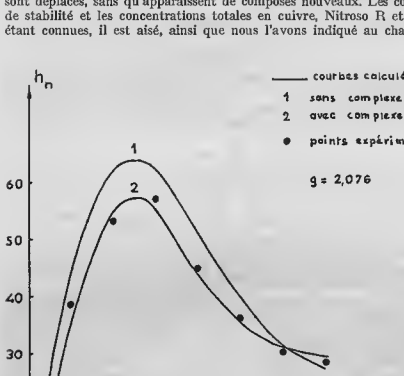
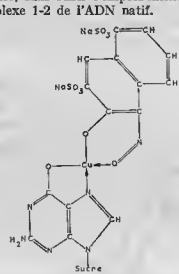


FIG. 27. — Intensité h_n pour le système ADN-Cu-Nitroso R.

de déterminer toutes les concentrations des complexes en présence. A l'aide des coefficients moléculaires de résonance magnétique précédents, on peut tracer la courbe théorique de h_n (fig. 27). Les écarts avec la courbe expérimentale sont tels qu'il faut faire appel à un mécanisme supplémentaire.

Source : MNHN, Paris

Le complexe cuivre-guanine (I) possède deux liaisons de covalence libres, elles peuvent intervenir dans la formation d'un complexe ternaire de formule II. La configuration plane du Nitroso R l'autorise à se glisser au voisinage de la base, sans subir l'empêchement stérique qui s'oppose à l'existence du complexe 1-2 de l'ADN natif.



Formule II.

De très nombreux exemples de complexes mixtes sont mentionnés dans la littérature. Wacker et coll. (10) ont signalé une telle éventualité dans le cas de l'ADN, de l'ion Fe^{3+} et de la 1-10 phénanthroline. Kohn (87) a montré que la tétracycline se fixe sur l'ADN, vraisemblablement par l'intermédiaire d'ions bivalents. Ce mécanisme se produit fréquemment, par ailleurs, dans les réactions du type enzyme-métal-substrat (85) - (86).

Dans une telle hypothèse, les équations des équilibres chimiques doivent être modifiées, en introduisant un coefficient moléculaire de résonance ε'_s et une constante de stabilité K_T pour le complexe ternaire S Cu N :

$$K_T = \frac{[S\ Cu\ N]}{[S] \cdot [Cu\ N]}$$

[S] représente la concentration en sites guanine libres et [S Cu N] la concentration en complexe ternaire.

Se reporter au chapitre II, § 2.2.3 pour le développement des équations et de la méthode de calcul utilisées pour résoudre ce système complexe. Les résultats ont été obtenus à l'aide d'un ordinateur CAB 500.

Les conclusions, auxquelles nous sommes arrivés, sont les suivantes :

— Dans la limite des erreurs sur h_n (6 %), cette hypothèse est suffisante pour expliquer les résultats expérimentaux.

— Le coefficient ε'_s est égal à $6{,}3 \cdot 10^4 \pm 1 \cdot 10^4$ · ; l'erreur importante sur ce coefficient découle de l'incertitude sur h_n.

— Pour la même raison, la constante de stabilité K_T est relativement imprécise. La correction, introduite en faisant intervenir le complexe ternaire, est pratiquement maximale dès que K_T est égale à $10^4\ M^{-1}$.

Source : MNHN, Paris

Pour cette valeur, les sites guanine sont occupés à plus de 95 % par le complexe ternaire. Une augmentation de K_T ne produit plus qu'un faible accroissement de la concentration en complexe ternaire, car le nombre de sites accessibles S_0 a une valeur finie. La variation correspondante sur ε'_3 devient négligeable.

Il est donc possible d'admettre que la valeur $K_T = 10^6 M^{-1}$ est une limite inférieure suffisante pour rendre compte des résultats des mesures. Sur la figure 27, nous avons tracé la courbe représentant h_m calculée. Nous pouvons donc estimer que nos hypothèses, nécessaires pour expliquer les résultats expérimentaux, sont aussi suffisantes. Un autre mécanisme pourrait difficilement être envisagé d'après notre étude des systèmes ADN-cuivre et Nitroso R-cuivre. La formation d'un complexe ternaire apparaît comme le mécanisme complémentaire le plus probable.

III. — DISCUSSION

3.1 Cas des nucléosides et des nucléotides.

Les résultats présentés aux paragraphes 2.1 et 2.2, et, en particulier, la comparaison des courbes 15 et 19, nous montrent que les nucléotides ont une action complexante supérieure à celle des nucléosides homologues pour une plus faible concentration.

Ceci s'explique en partie par l'existence, dans les nucléotides, d'un groupement phosphate supplémentaire susceptible de complexer du cuivre mais, en outre, par l'accroissement du caractère basique des hétérocycles, allant de pair avec une augmentation de la stabilité des complexes. Le même phénomène s'observe pour les constantes d'acidité (88).

Il est donc vraisemblable, ainsi que nous l'avons supposé au paragraphe 2.2, que le cuivre se fixe surtout au niveau de l'azote 7 des groupements guanine de l'ADN, la désoxyguanosine et l'acide d GMP s'étant révélés les complexants les plus actifs.

3.2 Cas de l'ADN.

3.2.1 *ADN natif.*

a) Tout ce qui précède laisse supposer que les guanines de l'ADN forment avec le cuivre un complexe 1-1, représenté par la formule I. Les liaisons hydrogène, qui lient les groupements guanine et cytosine des deux chaînes complémentaires de la macromolécule, ne font pas intervenir l'azote 7 de la guanine. La formation du complexe peut donc s'effectuer, même lorsque la macromolécule n'est pas dénaturée, l'ion pouvant se trouver au voisinage des bases, sans modifier la chaîne polynucléotidique.

La structure en double hélice provoque un empêchement stérique pour la formation du complexe 1-2. Deux sites guanine ne peuvent être suffisamment voisins pour que des liaisons « latérales » se créent, par l'intermédiaire du métal.

Source : MNHN, Paris

b) La constante de stabilité du complexe 1-1 diminue lorsque la force ionique augmente. Ceci est conforme à la loi de Debye pour un complexe MA, qui s'écrit en première approximation :

$$\log K_0 = \log K - 0{,}506\sqrt{\mu}\,(Z_{M}^2 - Z_{A}^2 - Z_{X}^2)$$

K est la constante d'équilibre à la force ionique μ. Z_X représente la charge ionique du composé X.

En outre, le rayon de giration de la macromolécule diminue lorsque la force ionique augmente, le nombre de sites accessibles est donc plus faible.

Nous n'avons pas étudié, de façon systématique, l'influence des caractéristiques morphologiques sur S_0; pour cela il faudrait disposer d'un grand nombre d'échantillons. Cependant, ces caractéristiques jouent vraisemblablement un rôle important puisque S_0, dans des conditions de milieu identiques, est différent selon le lot d'ADN. Ceci explique que la valeur de S_0 soit inférieure à la concentration totale en guanines présentes dans l'ADN (21,5 % des nucléotides pour le thymus de veau), la valeur maximale ne pouvant être atteinte que pour des concentrations en ADN et des forces ioniques plus faibles que celles autorisées par notre méthode d'étude.

3.2.2. *ADN dénaturé.*

Lorsque la macromolécule a été dénaturée par la chaleur, il n'est plus possible d'interpréter les spectres de RPE par l'existence d'un complexe 1-1 unique. En particulier, une décomposition graphique met en évidence un nouveau signal dont le facteur de Landé est plus proche de $g = 2$ que celui du complexe 1-1. Afin de tenter de résoudre ce problème, nous nous sommes référés aux remarques du paragraphe 2.3.3 : pour une force ionique 10^{-1}M, la fixation sur les phosphates est négligeable et d'autre part il y a proportionnalité entre l'intensité h_n, mesurée à $g = 2{,}257$, et la concentration en cuivre ionique.

Pour un échantillon d'ADN V 268, nous avons donc calculé les concentrations en cuivre libre $[Cu]_n$ et en cuivre complexé $[[Cu_0]_n - [Cu]_n]$, sans préjuger de la nature de ce dernier. Si, par analogie avec ce qui précède, nous traçons la courbe expérimentale $[Cu]_n = f([Cu]_n / ([Cu_0]_n - [Cu]_n))$, nous constatons (fig. 28) que nous obtenons à nouveau une droite : il lui correspond un rapport $S_0/P_0 = 15 \pm 0{,}5$ % et une constante de stabilité apparente égale à $2{,}7 \cdot 10^3\ M^{-1}$.

On ne peut cependant admettre que la fixation du cuivre se fait d'une manière analogue pour l'ADN natif et dénaturé; pour ce dernier, en effet, les variations de l'intensité h_n, mesurées à $g = 2{,}065$, ne permettent pas de retrouver les valeurs précédentes de S_0 et K_0.

L'apparition d'un signal paramagnétique supplémentaire doit être attribuée à la formation du complexe 1-2.

Pour résoudre les équations correspondant aux équilibres chimiques qui existent en solution, selon l'hypothèse précédente, nous avons analysé les modifications de l'intensité h_n (pour $g = 2{,}065$), en utilisant les valeurs approchées des concentrations des deux complexes 1-1 et 1-2 déduites de décompositions graphiques, en faisant intervenir des méthodes d'itération et en traçant les surfaces représentatives des variations des différentes constantes (coefficients moléculaires de résonance, constantes de stabilité et nombre de sites actifs) que l'on peut envisager pour un tel système.

Source : MNHN, Paris

D'après cette étude, que nous ne développerons pas en détail, nous proposons un modèle réactionnel compatible avec les résultats expérimentaux et la structure de l'ADN dénaturé telle qu'elle est généralement admise :

— L'augmentation de la concentration en cuivre total déplace les équilibres vers la formation du complexe 1-1 seul; par suite, le nombre de sites actifs S_a, lorsque le nombre de pontages dus au complexe 1-2 est faible, est bien celui déduit précédemment des variations de la fonction

$$[Cu]_n = f\left([Cu]_n/([Cu_0]_n - [Cu]_n)\right)$$

soit $S_a/P_a = 15 \pm 0{,}5$ %.

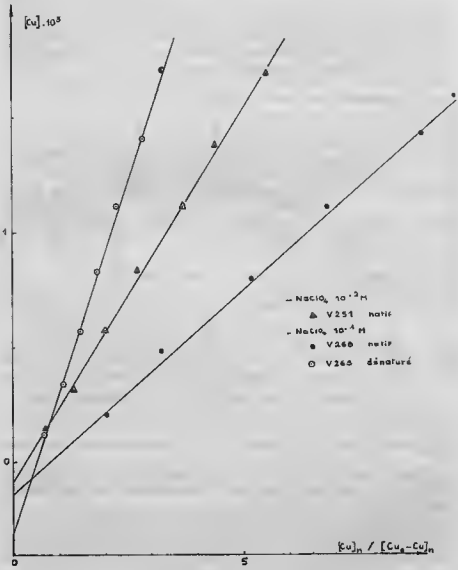


FIG. 28. — Fonction $[Cu]_n = f\ ([Cu_0]_n - [Cu]_n)$ pour l'ADN.

Source : MNHN, Paris

— Nous pensons qu'il se forme effectivement un complexe 1-2 : la macromolécule étant partiellement en simple hélice, l'empêchement stérique qui s'oppose à la formation de ce complexe dans le cas de l'ADN natif est supprimé en partie, lorsque la macromolécule est dénaturée.

Le nombre de sites actifs n'agit pas d'une manière homogène lors de la formation des deux complexes 1-1 et 1-2; en effet, deux cas sont à envisager:

a) une certaine proportion αS_0 se trouve localisée sur les portions en double hélice résiduelles, de la macromolécule et ne pourra donc former, comme précédemment, que le complexe 1-1 (schéma I);

b) la proportion $(1 - \alpha) S_0$ des sites appartenant aux chaînes simples peut donner les deux complexes 1-1 et 1-2. Ces derniers peuvent établir des pontages entre deux portions en simple hélice. Ils augmentent la rigidité locale de ces deux chaînes; par suite, la mobilité des sites voisins disparaît, ce qui favorise la formation du complexe 1-1 (schéma II). Le coefficient α est donc une fonction du nombre de pontages.

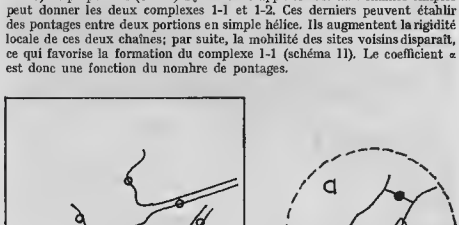


Schéma I. Schéma II.

- o Complexe 1-1.
- • Complexe 1-2.
- △ Site ne pouvant former que le complexe 1-1 du fait de la rigidité locale de la molécule.

Un tel système est évidemment très complexe et il est difficile d'en envisager une description quantitative satisfaisante, le nombre de paramètres inconnus étant trop élevé.

Cependant, il existe, indépendamment du mécanisme de fixation, une relation simple entre les concentrations en cuivre complexé et en cuivre ionique, qui nous fournit d'une part le nombre global de sites S_0 et d'autre part une constante apparente de fixation. Bien que la valeur de cette constante soit plus faible que dans le cas de l'ADN natif ($2{,}7 \cdot 10^2\ M^{-1}$ au

Source : MNHN, Paris

lieu de $7{,}1 \cdot 10^{3}\ M^{-1}$), l'augmentation de la fixation du cuivre, par suite de la dénaturation, est liée à un accroissement très important du nombre de sites accessibles; il passe de 4,2 % à 15 % (exprimé en nucléotides), dans le cas de l'ADN V 268, pour la force ionique $10^{-1}M$.

Il semble donc que la dénaturation, en détruisant la structure en double hélice, augmente l'accessibilité des sites guanine. La valeur plus faible de la constante apparente de stabilité est vraisemblablement due à une diminution parallèle du caractère basique des groupements actifs de la macromolécule.

3.2.3 *Conclusions.*

Nous pouvons comparer les résultats que nous venons d'exposer, dont certains ont fait l'objet de publications antérieures (89) - (90) - (91), aux études faites par d'autres, en particulier, à trois articles relatifs à la fixation du cuivre sur l'ADN, parus en 1965, (92) - (93) et (94). Leurs auteurs ont étudié l'effet de l'ion cuivrique sur les propriétés optiques de l'ADN, notamment son influence sur le mécanisme de la dénaturation thermique. Ils ont mis essentiellement en évidence les faits suivants :

La température T_m de « fusion » de l'ADN (c'est-à-dire la température à laquelle se produit la rupture des liaisons hydrogène responsables de la structure en double hélice) est abaissée en présence d'ions cuivriques. Cette dénaturation est induite à une température relativement basse, ce qui traduit une diminution de la stabilité des liaisons hydrogène.

Le cuivre s'oppose à la renaturation de la macromolécule au cours du refroidissement.

Les phénomènes précédents sont réversibles; ainsi, l'effet du cuivre est détruit par l'addition d'électrolytes ou d'agents complexants.

Ces résultats s'interprètent parfaitement en admettant que l'ion cuivrique se fixe au niveau des bases, empêchant ainsi la formation des liaisons hydrogène entre les deux chaînes complémentaires. Ils conduisent en outre à envisager la formation de pontages entre les bases, qui s'opposent évidemment à la renaturation au cours du refroidissement.

Les auteurs précédemment cités, à la différence de nos propres conclusions, n'ont pas mis en évidence la fixation de l'ion cuivrique sur les bases lorsque la macromolécule se trouve à l'état natif, les variations des propriétés optiques étant très faibles à la température ordinaire.

Cette contradiction n'est qu'apparente puisque :

— Le nombre de sites actifs sur l'ADN natif est faible. D'autre part nous avons opéré dans des conditions de concentration nettement plus élevées que celles de ces auteurs. La loi d'action de masse montre que les équilibres chimiques sont déplacés de telle façon que la proportion de métal fixé diminue en même temps que les concentrations des réactifs, les proportions relatives de ces derniers étant conservées.

— La fixation du cuivre sur les nucléotides n'introduit que de faibles modifications spectrales (94), car la fixation sur l'azote 7 des guanines atténue la stabilité des liaisons hydrogène mais conserve intacte, à la température ordinaire, la structure secondaire, responsable des propriétés optiques de l'ADN.

Source : MNHN, Paris

Pour ces raisons, l'action du cuivre ne peut avoir que deux effets :

— un abaissement de la température de « fusion » de l'ADN dû à l'affaiblissement des liaisons hydrogène;

— l'absence de renaturation au refroidissement, provenant de l'existence de pontages entre les deux chaînes de la macromolécule.

Eichhorn et coll. (92) supposent un pontage entre les guanines et les cytosines des deux chaînes complémentaires. Nous avons vu que nous envisageons une interaction guanine-guanine. Cette différence ne peut modifier notablement les conclusions qu'il est possible de tirer des mesures optiques.

Nous pouvons donc considérer que nos conclusions sont en accord avec celles des autres auteurs. Certaines contradictions n'étant qu'apparentes, les mécanismes que nous avons proposés sont susceptibles de rendre compte des résultats des mesures optiques. Par l'utilisation de la résonance paramagnétique électronique, nous avons pu déterminer la nature la plus probable du site interne de l'ADN actif vis-à-vis du cuivre, et donner une approche stoechiométrique que les auteurs précédents n'ont pu déduire de leurs mesures.

Source : MNHN, Paris

CHAPITRE IV

COMPLEXATION DE L'ION FERRIQUE

Pour le fer, à la différence de ce qui se passe avec les complexes du cuivre, nous avons rencontré un certain nombre de composés insolubles, dans le domaine de pH (4 à 10) où l'ADN ne subit pas de dégradation. Nous avons dû déterminer, par potentiométrie en milieu acide, d'une part les conditions d'hydrolyse de l'ion ferrique, d'autre part la formation des complexes entre cet ion et les désoxyribonucléosides et désoxyribonucléotides. Cette expérimentation ne peut être étendue à l'ADN puisque, dans ces conditions de pH, il est dégradé et insoluble. Cependant, les renseignements obtenus nous seront utiles pour l'interprétation des mesures de RPE intéressant les composés existant à des pH compris entre 4 et 7.

I. — ÉTUDE POTENTIOMÉTRIQUE EN MILIEU ACIDE

I.1 **Détermination des constantes d'hydrolyse de l'ion ferrique.**

Nous avons vu, au chapitre II, que les équilibres d'hydrolyse sont représentés par le polynôme :

$$b[H] = \beta_{11} + \beta_{12}[H]^{-1} + \beta_{13}[H]^{-2} + \ldots + 2M(\beta_{21} + \beta_{22}[H]^{-1} + \beta_{23}[H]^{-2} + \ldots)$$

On admet que, dans la zone où l'hydrolyse est faible, les complexes polynucléaires formés contiennent au maximum deux atomes de fer;

$b = 1/\alpha - 1$; (M : concentration en fer libre);

α : rapport du fer libre au fer total.

En déterminant, pour différentes concentrations en fer total, les courbes α (pH), on peut calculer les coefficients β_{ij} de l'équation précédente.

HEDSTRÖM (62), qui a fait ces mesures à force ionique 3 M en $NaClO_4$, interprète ses résultats par les équilibres suivants :

(1) $Fe^{3+} + H_2O \rightleftharpoons Fe(OH)^{2+} + H^+$; $\beta_{11} = (9{,}0 \pm 1{,}0) \cdot 10^{-4}M$

(2) $Fe^{3+} + 2\,H_2O \rightleftharpoons Fe(OH)_2^+ + 2H^+$; $\beta_{12} = (4{,}9 \pm 1{,}0) \cdot 10^{-4}M^2$

(3) $2\,Fe^{3+} + 2\,H_2O \rightleftharpoons Fe_2(OH)_2^{4+} + 2H^+$; $\beta_{22} = (1{,}22 \pm 0{,}10) \cdot 10^{-3}M$

Nos expériences, réalisées à force ionique 10^{-1}M, et les calculs que nous avons été amenés à faire, nous laissent envisager, en outre, la formation d'un complexe représenté par :

(4) $2\,Fe^{3+} + H_2O \rightleftharpoons Fe_2(OH)^{5+} + H^+$; β_{21}

Source : MNHN, Paris

la concentration Fe_h en fer hydrolysé s'exprime donc par l'équation :

$$(5) \qquad Fe_h = Fe\ (\beta_{11}[H]^{-1} + \beta_{12}[H]^{-2} + 2\ Fe\ (\beta_{21}[H]^{-1} + \beta_{22}[H]^{-2}))$$

Les constantes d'hydrolyse moyennes calculées ont pour valeurs :

$$\beta_{11} = (6{,}6 \pm 1) \cdot 10^{-4}\text{M}; \quad \beta_{12} = (6 \pm 1) \cdot 10^{-7}\text{M}^2$$

$$\beta_{21} = (6{,}7 \pm 1)\ 10^{-2}\ ; \quad \beta_{22} = (1{,}3 \pm 0{,}1) \cdot 10^{-3}\text{M}$$

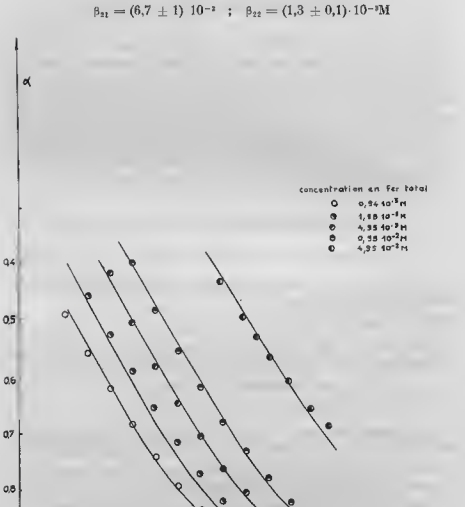


FIG. 29. — Courbes d'hydrolyse du fer.

Source : MNHN, Paris

Dans le cas du complexe 2-1, la charge importante portée par ce composé tend à rendre sa constante de stabilité très sensible aux variations de force ionique, conformément à la loi de Debye. Ceci explique que la concentration de ce complexe soit négligeable dans les conditions d'HEDSTRÖM.

Sur la figure 29, sont tracées les courbes α (pH) pour les concentrations suivantes en fer total :

$0{,}94 \cdot 10^{-3}$M ; $1{,}98 \cdot 10^{-3}$M ; $4{,}95 \cdot 10^{-3}$M ; $0{,}99 \cdot 10^{-2}$M ; $4{,}95 \cdot 10^{-2}$M

Les traits pleins correspondent aux valeurs calculées à partir des constantes précédentes. L'accord avec l'expérience est assez bon pour les quatre premières courbes, il l'est moins pour la dernière; ceci est dû au fait que la formation des différents complexes fait varier la force ionique de 20 % au cours des mesures. Les activités chimiques ne restent donc plus rigoureusement constantes. Nous n'avons donné les courbes que pour $\alpha \geqslant 0{,}4$ car BIEDERMANN et coll. (66) ont montré que, pour $\alpha < 0{,}6$, les composés en présence se trouvent sous une forme métastable provoquant une précipitation très lente d'hydroxyde ferrique.

Dans ce qui suit, la concentration en fer hydrolysé apparaîtra comme un terme correcteur dans les équilibres, et les constantes précédentes pourront être utilisées jusqu'à un pH voisin de 3.

1.2 Détermination des constantes d'acidité des désoxyribonucléotides.

Nous avons explicité, au chapitre II paragraphe 3.3.1, les méthodes de calcul par lesquelles on obtient, à partir des courbes de pH, les valeurs des pK_a des agents complexants.

Ces courbes ont été réalisées en titrant par NaOH 3 M des solutions 10^{-2}M en nucléotides, en milieu perchlorique 10^{-1}M.

Sur la figure 30, nous avons représenté les fonctions de formation $\bar{n} = f(\text{pH})$ des quatre désoxyribonucléotides. Les valeurs du pH, pour $\bar{n}$ égal à un demi-entier, nous donnent les pK_a. Les résultats sont groupés dans le tableau suivant :

	Phosphate primaire	Amino	Phosphate secondaire	Hydroxyle
Acide désoxyguanylique. .	0,83*	2,33	6,15	9
Acide désoxyadénylique . .	1,55	4,03	6,45	—
Acide désoxycytidylique. .	1,57	4,80	6,85	—
Acide thymidylique. . . .	1,45	—	6,57	10,3

* Cette valeur est extrapolée.

Source : MNHN, Paris

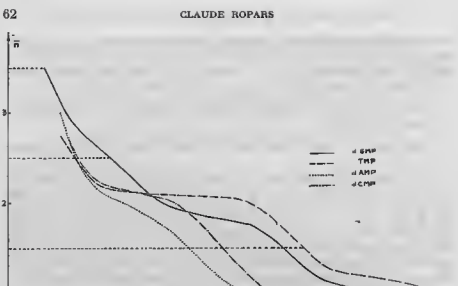


FIG. 30. — Fonctions de formation des nucléotides.

1.3 Fixation de l'ion ferrique sur les désoxyribonucléosides et les désoxyribonucléotides.

Nous avons déterminé les fonctions α (pH) des solutions contenant $[Fe_0] = 0{,}94 \cdot 10^{-2}$M; [agent complexant] $= 2 \cdot 10^{-2}$M.

Les agents complexants sont les désoxyribonucléosides, les désoxyribonucléotides, ainsi que l'orthophosphate disodique et l'acide cytidylique (constituant de l'ARN dans lequel le désoxyribose est remplacé par le ribose).

Sur les figures 31 et 32 sont tracées les courbes α (pH) pour tous ces composés, ainsi que la courbe d'hydrolyse d'une solution de fer de concentration $0{,}94.10^{-2}$M. Elles traduisent directement la proportion de fer libre en solution pour une valeur donnée du pH.

1.3.1 *Nucléosides.*

Nous pouvons en conclure que la fixation de l'ion Fe^{3+} sur les désoxyribonucléosides est faible; les différences entre ces agents complexants sont peu significatives, cependant, il est possible de placer ces composés par ordre de complexation croissante :

thymidine < désoxycytidine = désoxyguanosine < désoxyadénosine.

Étant donné la faible action complexante des nucléosides, nous n'avons pas entrepris une détermination quantitative des constantes de stabilité.

Source - MNHN, Paris

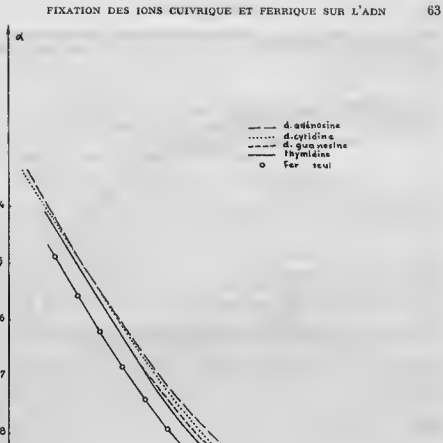


FIG. 31. — Fixation du fer sur les nucléosides.

1.3.2 *Nucléotides.*

La figure 32 montre que la proportion en fer complexé augmente considérablement lorsque l'agent complexant est un nucléotide ou un orthophosphate disodique. Pour ce dernier composé, GALAL-GORCHEV et coll. (71) interprètent leurs mesures par la formation des complexes $FeH_2PO_4^{2+}$ et $FeHPO_4^{+}$.

Nous avons tenté, de la même manière, d'analyser nos résultats en supposant la formation des complexes analogues de formules :

(I) $(NH_2\ R\ PO_3\ H\ Fe)^{2+}$
(II) $(NH_2\ R\ PO_3\ H\ Fe)^{2+}$
(III) $(NH_2\ R\ PO_3\ Fe)^{+}$

Source : MNHN, Paris

où R représente les groupements chimiques qui varient avec la nature de la base du nucléotide. Dans l'acide thymidylique, le groupement NH_2 n'existe pas.

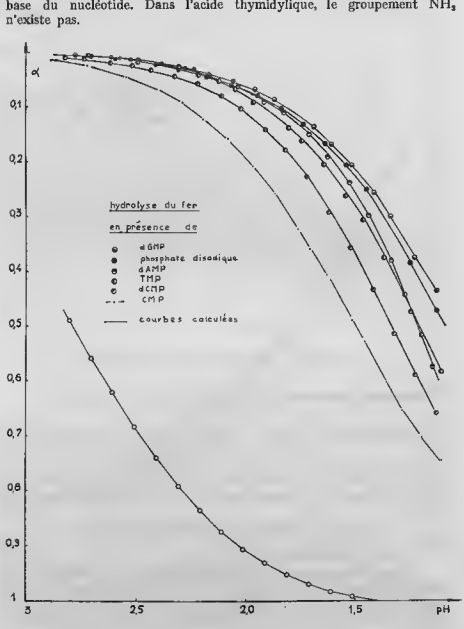


FIG. 32.

Nous avons développé au chapitre II paragraphe 3.3.2. les équations correspondant à ce mécanisme. En particulier, nous avons montré que la fonction expérimentale f (H, Fe) doit être de la forme :

$$f(\mathrm{H, Fe}) = \chi_1 [\mathrm{H}]^{-1} + \chi_2 [\mathrm{H}]^{-2} + \chi_3 [\mathrm{H}]^{-3}$$

Source : MNHN, Paris

Les constantes de stabilité des complexes I, II et III sont données par les équations :

$$K_1 = \frac{\chi_1}{K_{a_1}} ; \qquad K_2 = \frac{\chi_2}{K_{a_1} K_{a_2}} ; \qquad K_3 = \frac{\chi_3}{K_{a_1} K_{a_2} K_{a_3}}$$

K_{a_1}, K_{a_2} et K_{a_3} sont les constantes d'acidité successives des nucléotides.

Pour l'acide thymidylique et l'acide phosphorique, seules interviennent les deux premières constantes de stabilité puisqu'ils se comportent comme des diacides, dans le domaine de pH utilisé.

Par ces calculs, nous arrivons aux conclusions suivantes :

a) Si l'agent complexant est le phosphate disodique, nous retrouvons les résultats de GALAL-GORCHEV. Pour des constantes successives d'acidité égales respectivement à $2{,}30 \cdot 10^{-2}$ et $2{,}40 \cdot 10^{-7}$, les constantes χ_1 et χ_2 ont pour valeur 35 et 3,47.

b) Pour les trois nucléotides à fonction amino, la constante χ_1 est nulle. Il est donc nécessaire que le groupement NH_3^+ ait perdu sa charge positive pour qu'il y ait complexation. Seuls se forment les complexes II et III.

Nous avons groupé dans le tableau suivant les valeurs de χ_2, χ_3, K_2 et K_3.

	χ_2	χ_3	K_2	K_3
d GMP	13	$1{,}85 \cdot 10^{-1}$	$1{,}9 \cdot 10^{6}$	$3{,}8 \cdot 10^{9}$
d AMP	4,25	$4{,}6 \cdot 10^{-2}$	$1{,}6 \cdot 10^{6}$	$4{,}9 \cdot 10^{8}$
d CMP	2,2	$4{,}1 \cdot 10^{-2}$	$5{,}1 \cdot 10^{5}$	$4{,}3 \cdot 10^{10}$

La lecture de ce tableau montre, qu'à un pH donné, la proportion en fer complexé augmente lorsque l'on passe de la cytosine à l'adénine puis à la guanine. Ce résultat apparaît clairement sur la figure 32.

Par contre, la stabilité des complexes formés avec les groupements ionisés représentée par K_2 et K_3 varie en sens inverse. Cette apparente contradiction est due à l'intervention des constantes d'acidité dans les expressions de K_2 et K_3. A un certain pH, le nombre accru de formes ionisées actives favorise la complexation lorsque l'on passe de la cytosine à l'adénine puis à la guanine.

L'importance des constantes d'acidité dans l'écriture des équations chimiques ne permet pas de définir, à partir des valeurs de χ_2, χ_3, K_2 et K_3, un ordre de stabilité croissante pour les complexes des différents nucléotides, la concentration en formes ionisées variant d'un agent complexant à l'autre. Il faut au contraire se baser sur le résultat global tel qu'il apparaît sur la figure 32.

BJERRUM (95) et PERRIN (96) ont montré que, dans le cas d'agents complexants possédant un groupement acide et un groupement basique

Source : MNHN, Paris

(cas des acides aminés en particulier), il existe une relation linéaire entre le logarithme de la constante de stabilité du complexe et le pK_a du groupement basique.

De même, nous avons noté une telle relation dans le cas des complexes II et III :

$$\log K_3 = 0{,}95\ pK_{a_3} + 2{,}25$$

$$\log K_3 K_4 = 1{,}71\ pK_{a_3} + 9{,}1$$

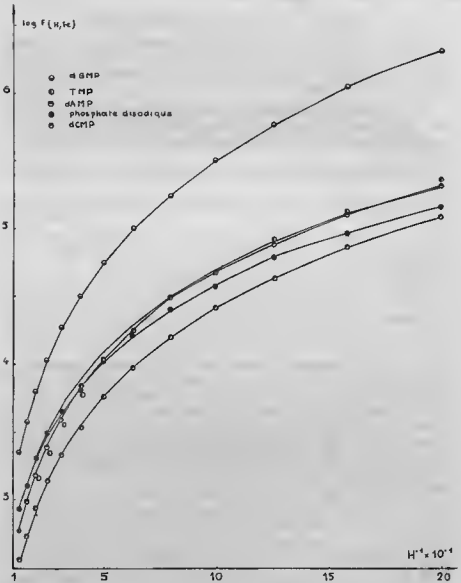


FIG. 33. — Fonction log. $(\chi_1 H^{-1} + \chi_2 H^{-2} + \chi_3 H^{-3})$.

Source : MNHN, Paris

c) pour l'acide thymidylique, les résultats sont moins bons; la constante γ_1 est toujours nulle, contrairement à ce que l'on observe avec le phosphate disodique; la constante γ_2 n'est pas suffisante pour représenter entièrement le phénomène, elle prend une valeur moyenne $\gamma_2 = 4{,}95$: des complexes 1-2 ou des complexes hydroxylés se forment vraisemblablement. Nos essais d'interprétation n'ont pas été satisfaisants.

Sur la figure 33 sont portées les valeurs expérimentales, et celles calculées à partir des données précédentes, pour le polynôme *f* (Fe, H) (nous l'avons exprimé sous forme de logarithme, pour que la comparaison des courbes soit simplifiée).

D'après les formules et les résultats obtenus, l'ion ferrique se fixe sur les groupements phosphates des nucléotides; pour les acides d GMP, d AMP et d CMP, le groupement amino fait partie de la structure des complexes.

Ceci ne peut s'expliquer que par la formation d'un cycle entre les acidités phosphoriques et le groupement amino de la base, par l'intermédiaire de l'ion métallique. Le complexe III de l'acide d AMP aurait la formule de la figure 34. Il est vraisemblable que l'azote (1), voisin du groupement amino, participe à la structure de ce complexe par l'intermédiaire d'une liaison de coordinence.

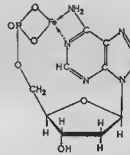


FIG. 34. — Complexe Fe^{+3} - d AMP.

L'existence d'un complexe analogue pour l'acide d GMP, dans lequel le groupement amino est porté par le carbone 2, nous montre que l'azote 7, sur lequel se fixe l'ion cuivrique comme nous l'avons vu précédemment, n'intervient plus dans la complexation de l'ion ferrique. Le site actif semble donc ne pas être le même pour ces deux ions.

d) Par ailleurs, d'après la figure 32, l'acide désoxycytidylique et l'acide cytidylique complexent l'ion ferrique de façon différente. Le mécanisme en est cependant identique puisque, pour des pK_a successifs de l'acide cytidylique respectivement égaux à 0,65, 4,0 et 6,15, le phénomène est décrit correctement par les constantes de stabilité $\gamma_1 = 0$; $\gamma_2 = 4{,}1$; $\gamma_3 = 3{,}45\ 10^{-3}$.

Il est difficile d'imaginer une interaction directe sucre-métal dans un complexe du type de la figure 34. Dans les relations linéaires entre le logarithme de la constante de stabilité du complexe et le pK_a du groupement basique, définies plus haut, les coefficients numériques dépendraient de la nature du sucre. Les groupements amino et phosphates semblent étroitement liés du point de vue électronique par l'intermédiaire du sucre, leurs interactions étant influencées par la nature de ce dernier.

Source : MNHN, Paris

La stabilité d'une liaison chimique contractée par le groupement phosphate serait donc sous la dépendance de la nature de la base et du sucre du nucléotide. Ceci est à rapprocher de l'accroissement de la stabilité des complexes de l'ion cuivrique lorsque l'on passe du nucléoside au nucléotide et au polymère.

II. — ÉTUDE PAR RÉSONANCE PARAMAGNÉTIQUE ÉLECTRONIQUE

De nombreux composés précipitent à partir des solutions de sels ferriques, au-delà de pH 3; pour leur étude, nous avons effectué des mesures de RPE.

2.1 Cas des nucléosides et des nucléotides.

2.1.1 *Cas des désoxyribonucléosides.*

Les complexes en milieu acide sont peu stables, nous avons pu constater qu'ils sont détruits par élévation du pH. A pH supérieur à 4, le fer est entièrement précipité sous forme d'hydroxyde; les nucléosides restent en solution, ainsi que le met en évidence un dosage spectrophotométrique.

Stukan et coll. (97) ont obtenu un résultat identique avec la guanosine. D'après les mesures d'effet Mössbauer, effectuées par ces auteurs, la fonction alcool en 5′ du sucre et les groupements amino des bases interviendraient. La stabilité d'un tel cycle ne peut, en effet, qu'être faible.

2.1.2 *Cas des désoxyribonucléotides.*

Une série de solutions a été préparée, les concentrations finales en fer et en désoxyribonucléotides étant respectivement $1{,}25 \cdot 10^{-3}$ M et $2{,}5 \cdot 10^{-3}$M. Les pH sont ajustés aux valeurs suivantes : 1,5; 2,2; 3,5; 5 et 7. Nous avons séparé les précipités par filtration sous vide, sans lavage des produits pour éviter toute modification éventuelle au cours de la séparation. Les spectres de RPE ont été tracés pour tous les précipités et les solutions à la température ambiante.

Tous les facteurs de Landé sont compris entre $g = 2{,}11$ et 2,02; la largeur des raies rend peu précise leur détermination et leurs différences sont faibles. Nous nous sommes donc attachés essentiellement à la mesure et à l'étude de la largeur des spectres de résonance.

Nous avons vu au chapitre II qu'une raie est d'autant plus étroite que le composé formé est plus stable. La largeur de raie serait un critère de mise en évidence de la formation de liaisons chimiques. Nous avons constaté, en outre, que le phénomène de saturation jouait un rôle important, les spectres étant analogues à ceux décrits sur la figure 8 *b*. Nous avons mesuré la largeur ΔH qui sépare les deux maxima des courbes dérivées que l'appareil enregistre directement.

Sur la figure 35, nous avons représenté ces différentes largeurs, la hauteur des signaux varie exactement en sens inverse, conformément à la figure 8 *b*. En milieu acide, nous retrouvons très sensiblement les résultats donnés par la potentiométrie. Ceci est une vérification du critère qualitatif de stabilité que nous avons retenu.

Source : MNHN, Paris

a) Cas des d AMP, d GMP et d CMP.

A pH supérieur à 3, l'ordre de complexation croissant vis-à-vis du fer est le suivant :

d GMP > d CMP > d AMP

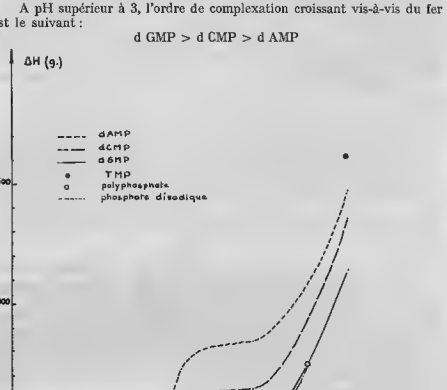


Fig. 35. — Largeur des raies des complexes du fer.

Entre pH 3 et 5, tous les précipités ont un rapport métal/nucléotide égal à 1, comme le montrent les dosages des solutions. Dans cette zone de pH, les courbes $\Delta H = f(pH)$ présentent un palier traduisant l'existence de composés définis. La largeur des raies est cependant plus grande qu'en milieu acide, ce qui implique une diminution de la stabilité des liaisons chimiques.

Ce résultat indiquerait que les groupements amino des bases cessent de former des liaisons de covalence avec le métal et sont remplacés par deux hydroxyles. Le phénomène serait analogue à celui provoquant la destruction

Source : MNHN, Paris

des complexes formés entre les nucléosides et le fer, pour un pH voisin de 4.

A partir de pH 5, les produits tendent à se resolubiliser, les solutions et les précipités prennent une coloration qui varie du jaune au marron. La concentration en ion ferrique total n'est plus nulle, à pH 7, dans le cas des solutions contenant les d AMP et d CMP. En outre, l'intensité des signaux de RPE diminue.

A pH 7, les spectres des composés contenant les acides d AMP et d CMP ont une résonance en champ nul.

b) Cas de l'acide thymidylique.

L'acide TMP, qui, selon les mesures potentiométriques, n'est lié au métal que par les acidités phosphoriques, a tendance à rester en solution dès les pH acides, comme le font les autres nucléotides à partir de pH 5.

Nous n'avons pu faire de mesures magnétiques, pour ce nucléotide, à pH 3,5 et 5, les composés formés étant solubles et ne donnant que des signaux très faibles; la sensibilité de l'appareil est alors insuffisante. A partir de pH 7, les produits ne sont que partiellement solubles, ce qui nous a permis de tracer le spectre du précipité.

c) Cas d'un polyphosphate et de l'acide orthophosphorique.

Nous avons également représenté les résultats relatifs au phosphate disodique et à un polyphosphate (sel de Graham). Pour ce dernier, nous avons opéré à un pH supérieur à 4 pour éviter une hydrolyse acide du polymère; aucun précipité n'apparaissait dans les solutions correspondantes.

Le comportement du polyphosphate est identique à celui des nucléotides à partir de pH 5. Le phosphate semble, par contre, nettement plus résistant à l'hydrolyse, sans doute du fait qu'il forme des complexes polynucléaires, difficiles à envisager pour le polyphosphate.

La différence de réactivité entre acide thymidylique, polyphosphate, acide orthophosphorique d'une part, les autres nucléotides d'autre part, tendrait à confirmer la rupture de la liaison amino-métal aux environs de pH 3,5. Tous les autres résultats s'interprètent par la fixation de groupements OH^- au niveau de l'ion ferrique, avec formation d'hydroxo-complexes, sous une forme plus ou moins micellaire. Bien que la liaison base-métal n'existe vraisemblablement plus à partir de pH 3,5, le comportement du fer au niveau des acidités phosphoriques est lié à la nature de la base (voir fig. 35). Nous retrouvons ainsi la conclusion à laquelle nous avions abouti à la suite des mesures potentiométriques (voir paragraphe 1.3.2. *d*).

2.2 Cas de l'ADN.

Les données bibliographiques concernant les spectres de RPE des complexes nucléotides-fer sont pratiquement inexistantes, tandis que, pour l'ADN, de nombreux travaux ont été effectués, comme nous l'avons rappelé au chapitre 1.

Plusieurs auteurs ont étudié les spectres de RPE des acides nucléiques dopés par l'ion Fe^{3+}, en particulier Blois (22), Maling (23), Walsh (45). Par ailleurs, Eisinger et coll. (44) ont suivi cette complexation par des mesures de temps de relaxation nucléaire. D'après l'ensemble de ces

Source - MNHN, Paris

recherches, les signaux de RPE des acides nucléiques seraient dus à la juxtaposition de plusieurs raies de résonance. Walsh en a résumé les principales caractéristiques :

— la première raie, centrée au voisinage de $g = 2$, large de plusieurs centaines de gauss est attribuée à l'ion Fe^{3+} ($S = 5/2$) placé dans un site cubique « externe » constitué par les groupements phosphates de la macromolécule.

— la deuxième, centrée au voisinage de $g = 4$, fortement asymétrique, correspondrait à un ion ($S = 5/2$), dans un potentiel de symétrie cylindrique qui peut être lié à un site « interne », vraisemblablement dû à la rupture des liaisons hydrogène qui relient les bases. Cette éventualité d'une fixation « interne » est en outre suggérée par Eisinger.

— la troisième, voisine de $g = 2{,}6$, apparaît dans un certain nombre de cas; les auteurs précédents la rattachent à des inclusions ferromagnétiques liées à la macromolécule.

Sur la figure 36, nous avons tracé le spectre décrit par Walsh et coll.

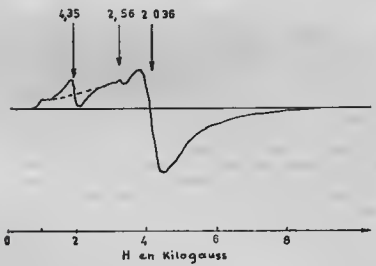


Fig. 36. — Spectre d'un ADN dopé par le fer (d'après Walsh).

Pour tenter de compléter ces résultats, nous avons enregistré, à la température ambiante, les spectres de RPE d'ADN natif et dénaturé, dopé par du fer III, aux pH 6 et 8,5.

2.2.1 *Mode opératoire.*

Nous avons initialement effectué le dopage de l'ADN à l'aide d'une solution de perchlorate ferrique dont le pH est voisin de 2. Le pH de la solution d'ADN était fixé aux environs de 7. Nous avons pu constater que l'addition de solution ferrique provoquait l'apparition de filaments d'ADN, dus probablement à une dénaturation acide locale de la macromolécule (3)-(98). Pour les mêmes raisons, un essai de dopage par dialyse n'a pas été satisfaisant.

Source : MNHN, Paris

Pour éviter cette dénaturation, nous avons noté qu'en neutralisant la solution ferrique jusqu'à pH 4,2, à l'aide de bicarbonate de sodium, les complexes formés entre l'ion Fe^{3+} et le bicarbonate, bien que peu stables, empêchent la formation de précipités d'hydroxyde ferrique, du moins pendant un temps suffisant pour permettre le dopage homogène de l'ADN, sans dénaturation partielle.

Dans ces conditions, il nous a été possible d'ajouter à une solution d'ADN (300 mg/100 ml), une quantité de fer telle que le rapport nucléotides/fer soit égal à 8,15. L'addition de fer est effectuée lentement sous agitation permanente, le mélange est alors parfaitement homogène. Le pH de la solution est constamment ajusté par des additions d'acide ou de base dilués.

Après une durée d'agitation, variable selon l'échantillon, l'ADN est précipité par l'alcool ou le mélange alcool-éther et séché sous vide.

Lorsque nous avons abordé le cas de l'ADN dénaturé, la dénaturation a été faite de façon analogue à celle mentionnée au chapitre III, paragraphe 2.3.4.

2.2.2 *Résultats.*

Les spectres que nous avons obtenus sont conformes aux caractéristiques définies précédemment, avec cependant des modifications de forme et d'intensité. Nous nous efforcerons de préciser les variations essentielles que leur font subir les conditions de préparation des échantillons.

a) Les spectres sont constitués principalement par une raie large d'environ 600 gauss (entre les deux pics du signal dérivé), centrée au voisinage de $g = 2$. Pour un échantillon dopé rapidement, le facteur de Landé est voisin de $g = 2{,}15$. Si l'homogénéisation de la solution est poursuivie pendant plusieurs heures, ce facteur diminue et se rapproche de $g = 2{,}09$.

Cette raie, dissymétrique, semble résulter de la superposition de plusieurs spectres élémentaires conduisant à une structure complexe.

Un faible signal à $g = 2{,}6$ n'apparaît pas de manière systématique, il peut être rattaché à la variation de la structure principale; par ailleurs, il ne nous a pas été possible de l'attribuer avec certitude à la précipitation d'inclusions ferromagnétiques.

b) Le signal centré à $g = 4$, contrairement à ce qui est mentionné par Walsh et coll., ne se retrouve pas sur tous les spectres, mais seulement pour l'ADN dénaturé et à pH 8,5. En particulier à pH 6, il n'y a pas de différences significatives entre les spectres d'ADN natif ou dénaturé.

c) Dans le cas de l'ADN dénaturé, dopé à pH 8,5, la raie principale est plus étroite (500 gauss) qu'à pH 6, par suite sans doute d'une stabilité plus grande des complexes formés.

d) Les échantillons préparés en milieu basique présentent une absorption en champ nul.

III. — DISCUSSION

3.1 Cas des nucléosides et des nucléotides.

Nous venons de voir que l'ion ferrique peut se fixer sur les bases des nucléosides et des nucléotides; toutefois, les liaisons formées sont détruites quand le pH augmente.

Source : MNHN, Paris

Le métal, en outre, donne des complexes stables avec les groupements phosphates; ces composés peuvent être plus ou moins hydroxylés selon la valeur du pH.

Dans le domaine de pH où l'ADN est stable, ces complexes peuvent être rangés par ordre de stabilité croissante. Cette stabilité est fonction de la nature de la base et du sucre du nucléotide, bien qu'il ne semble pas y avoir de liaisons chimiques directes entre ces molécules et l'ion métallique.

Comme on le voit sur la figure 35, pour les nucléotides, la stabilité croît lorsque la base est respectivement : thymine, adénine, cytosine et guanine.

3.2 Cas de l'ADN.

Pour l'ADN, les phénomènes sont complexes; en nous rapportant à ce qui précède, nous proposons un modèle susceptible d'expliquer les spectres de RPE enregistrés par nous ou par les auteurs précédemment cités.

3.2.1 *ADN natif.*

a) Le comportement des groupements phosphates est directement influencé par la nature de la base, pour les nucléotides. Lorsque l'on passe au polymère, il est normal qu'il en soit de même.

On peut penser qu'un certain type de séquence des bases dans la macromolécule s'accompagne, au niveau des groupements phosphates, d'une véritable « modulation » de la réactivité de la chaîne phospbodiester vis-à-vis du fer, sans que, dans les complexes formés, intervienne une liaison chimique entre le métal et les groupements basiques.

Tous les phosphates n'auraient pas une réactivité homogène; il existerait certains sites privilégiés sous la dépendance des séquences de la macromolécule.

Nous avons vu que les signaux de RPE se modifient avec la durée d'homogénéisation de la solution contenant l'ADN dopé. Ce phénomène tendrait à confirmer l'hypothèse précédente, dans la mesure où l'ion ferrique, réparti initialement au voisinage de tous les phosphates, de façon désordonnée, semble migrer lentement vers un certain nombre de sites phosphates pour lesquels la stabilité des complexes est accrue.

L'ion ferrique formerait donc plusieurs complexes avec les groupements phosphates. Ceci se traduirait, du point de vue magnétique, par l'apparition, au voisinage de $g = 2$, d'une raie de résonance dissymétrique dont la structure varie avec l'échantillon.

Ces complexes peuvent en outre se combiner à un certain nombre de groupements OH^-, lorsque le pH s'élève, pour donner des hydroxocomplexes.

b) Il serait possible d'expliquer l'absorption en champ nul de certains échantillons par l'existence de ces hydroxocomplexes, puisque un tel phénomène a été observé, d'une part dans le cas de certains nucléotides à pH 7 et d'autre part pour des échantillons d'ADN préparés à pH 8,5.

Nous n'avons trouvé de signal à $g = 4$, ni sur des échantillons d'ADN natif, ni pour des nucléotides.

3.2.2 *Cas de l'ADN dénaturé.*

Le signal à $g = 4$, d'après Walsh et coll. (45), existe toujours. Pour notre part, nous ne l'avons mis en évidence d'une manière notable qu'avec des échantillons d'ADN dénaturé, dopés à pH 8,5.

Source : MNHN, Paris

Ces auteurs ont effectué leur dopage à l'aide d'une solution de chlorure ferrique sans prendre, semble-t-il, la précaution de neutraliser partiellement la solution du sel métallique. En tenant compte de la remarque faite au paragraphe 2.2.1, il se pourrait qu'il y ait eu alors une certaine dégradation acide de l'ADN.

Eisinger et coll. (44), par des mesures de temps de relaxation, ont aussi admis cette fixation « interne »; mais les conditions de pH, dans lesquelles ils ont opéré, rendent encore plus facile la dénaturation partielle de l'ADN.

Pour cet ensemble de raisons, nous estimons que le signal à $g = 4$ ne peut apparaître qu'avec un ADN partiellement dégradé. A l'appui de cette hypothèse, nous rappellerons que Walsh et coll. ont montré que ce signal est plus important si le dopage est effectué à 75°C, c'est-à-dire lorsque la structure secondaire de la macromolécule est fortement perturbée.

Conformément à l'opinion de ces auteurs, il est donc possible d'attribuer ce spectre à un complexe « interne ». Il peut prendre naissance lorsque la double hélice de la macromolécule est partiellement détruite, l'ion ferrique venant s'insérer entre deux bases complémentaires en remplaçant les liaisons hydrogène.

D'après nos résultats sur les nucléotides et compte tenu du fait que l'élévation du pH favorise la formation de ce complexe, nous en proposons une formule.

En effet, l'« interbase » guanine-cytosine semble le site de fixation le plus favorable, la structure octaédrique pouvant être complétée par l'intervention de deux hydroxyles. Ce complexe aurait la formule de la figure 37.

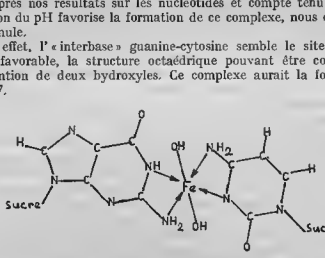


Fig. 37. — Structure du complexe G-fer-C.

Il pourrait apparaître, sans modifications importantes des liaisons voisines, dans la double hélice, le couple guanine-cytosine ayant la structure de la figure 38. Une légère dénaturation acide autoriserait sa formation.

Selon Fuwa et coll. (6), l'ARN précipite par chauffage en présence de cuivre et de fer, ces deux ions ayant un comportement identique vis-à-vis de la « déstabilisation » de la macromolécule. Un phénomène équivalent peut être imaginé pour l'ADN.

La dénaturation thermique aboutissant à une séparation de la double hélice, l'ion ferrique aurait la possibilité de réagir avec les bases de deux chaînes différentes. Les pontages, qui en résulteraient, provoqueraient la création d'agrégats et s'opposeraient à une renaturation de la macromolécule au cours du refroidissement.

Source : MNHN, Paris

Par ailleurs, un complexe analogue au précédent pourrait relier deux guanines appartenant à deux chaînes différentes, les effets qui en découleraient, pour la structure de l'ADN, en seraient identiques.

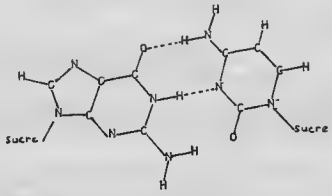


FIG. 38. — Structure de la paire G-C.

Le mécanisme que nous proposons pour expliquer la complexation de l'ion ferrique par l'ADN est similaire à celui que nous avons développé pour les interactions ADN dénaturé-cuivre, bien que les formules des composés envisagés soient différentes.

Source : MNHN, Paris

Chapitre V

CONCLUSIONS — PERSPECTIVES

Au cours de l'étude expérimentale précédente, nous avons mis au point des méthodes pour l'application de la résonance paramagnétique électronique aux complexes métalliques se présentant sous une forme non cristallisée.

Nous avons déterminé les caractéristiques essentielles des systèmes formés par les ions cuivrique et ferrique avec l'acide désoxyribonucléique et quelques uns de ses dérivés.

I. — RÉSONANCE PARAMAGNÉTIQUE ÉLECTRONIQUE

En raison de la nature particulière des recherches entreprises, il nous a fallu définir des critères spécifiques pour des complexes en solution ou amorphes.

De la comparaison des propriétés magnétiques de composés homologues, nous avons déduit la nature chimique des produits de fixation des ions Cu^{2+} et Fe^{3+} sur l'ADN, but essentiel de notre travail. Dans certains cas, spécialement favorables, il nous a même été possible d'en déterminer la stoechiométrie.

La complexité de cette méthode a rendu délicates les interprétations des spectres des composés ferriques. On peut penser que les améliorations ultérieures, en particulier tecbnologiques, augmenteront la précision et la reproductibilité des enregistrements et en feront un outil essentiel pour l'étude des complexes métalliques. D'ores et déjà, pour ces problèmes, la RPE apparaît comme complémentaire de la résonance magnétique nucléaire et de la mesure des temps de relaxation.

II. — FIXATION DES IONS CUIVRIQUE ET FERRIQUE

La réactivité spécifique de ces deux ions s'est traduite par des différences importantes dans nos résultats.

Pour le cuivre, dont les composés sont solubles, la stoechiométrie des équilibres a été établie et nous en avons tiré des renseignements plus détaillés que ceux des auteurs qui, en même temps que nous, ont abordé ce problème par des méthodes optiques.

Pour le fer, la solubilité trop faible des produits de réaction n'a pas permis une étude analogue; cependant, nos résultats magnétiques semi-quantitatifs, complétés par des mesures potentiométriques, ont contribué à élucider les mécanismes de fixation.

Nous avons mis en évidence deux types de sites réactionnels :

— L'un, dans le cas du cuivre, est classique; situé sur les bases, il possède une réalité chimique propre. La morphologie de la macromolécule et les conditions de milieu agissent sur la concentration accessible en

Source : MNHN, Paris

molécules susceptibles de réagir. Ces caractères nous autorisent à lui appliquer le terme de « site de configuration ».

— L'autre, que nous proposons pour expliquer les données relatives à la fixation de l'ion ferrique sur l'ADN, peut être, par opposition au précédent, assimilé à un « site de modulation » : son activité est liée à l'arrangement des bases, bien que ces dernières ne forment pas de liaison chimique avec le métal. L'information, recueillie au niveau de la séquence, est transmise aux phosphates par l'intermédiaire du sucre, dont la nature influe sur le phénomène.

L'existence de ce type original de site réactionnel semble importante dans la mesure où les hypothèses antérieures, sur la transmission radiale de l'information génétique du « cœur » vers l'extérieur de la macromolécule, en sont justifiées. En particulier, il permet d'expliquer le rôle biologique de certains ions qui, à priori, ne semblent pas devoir réagir avec un « site de configuration ». Ceci pourrait s'appliquer, entre autres, à l'ion Mg^{2+}, lié à l'action d'enzymes hydrolysantes selon un processus spécifique, mais qui, vraisemblablement, se fixe sur les seuls phosphates de la chaîne nucléique; sa complexation par des hétérocycles azotés est en effet peu probable.

Les modèles que nous avons proposés interprètent convenablement les données optiques et magnétiques actuelles. Découlant des mécanismes élémentaires de complexation, ils paraissent, en outre, moins hypothétiques que d'autres, préalablement envisagés.

Nous avons étudié, en détail, la formation d'un complexe ternaire entre l'ADN, le cuivre et un agent complexant extérieur. L'extension à l'ADN des concepts classiques qui régissent de nombreuses réactions enzymatiques du type enzyme-métal-substrat semble donc possible.

Perspectives.

Nos conclusions, relatives aux mécanismes chimiques fondamentaux liés à la réactivité des ions Cu^{2+} et Fe^{++}, peuvent être complétées de la manière suivante :

— d'une part, par des mesures analogues sur les acides ribonucléiques et les polynucléotides; ces derniers doivent confirmer quelques-unes de nos hypothèses;

— d'autre part, en délimitant l'influence de la morphologie de la macromolécule sur le « site de configuration » précédent.

A partir de nos résultats, il est possible d'aborder quelques réactions des acides nucléiques :

a) Formation de complexes ternaires avec des molécules biologiquement importantes, entre autres, certains agents de cancérisation et dérivés protéiques;

b) Catalyse exercée par des métaux sur des réactifs chimiques; notre étude peut, en particulier, aider à la compréhension de l'action de l'eau oxygénée sur l'ADN, en présence d'ions ferriques;

c) Influence des ions métalliques sur les complexes nucléoprotéiques, compte tenu de la présence éventuelle de liaisons covalentes spécifiques entre les deux macromolécules;

d) Interaction de l'ADN avec d'autres ions métalliques, selon les modèles réactionnels que nous avons proposés.

Source : MNHN, Paris

ANNEXE

Principe de la résolution du système ternaire ADN-cuivre-Nitroso R, par machine CAB 500.

Les équations relatives à ce système chimique ont été détaillées au chapitre II. Leur résolution a pu être menée à bien en utilisant la méthode suivante.

Après substitution des différentes inconnues dans les équations initiales, le système se simplifie et conduit à trois équations non linéaires à trois inconnues $[Cu]_n$, $[N]_n$ et $[S]_n$.

$$(29) \qquad [Cu_0] = [Cu]_n + \beta_1 \cdot [Cu]_n \cdot [N]_n + \beta_2 [Cu]_n \cdot [N]_n^2 + K_2 \cdot [Cu]_n [S]_n + K_T \cdot \beta_1 \cdot [N]_n \cdot [Cu]_n \cdot [S]_n$$

$$(30) \qquad [N_0]_n = ([N]_n)(1 + [H]/K_a) + \beta_1 \cdot [Cu]_n \cdot [N]_n + 2\,\beta_2 \cdot [Cu]_n \cdot [N]_n^2 + K_T \cdot \beta_1 \cdot [N]_n \cdot [Cu]_n \cdot [S]_n$$

$$(31) \qquad [S_0] = [S]_n + K_2 \cdot [Cu]_n \cdot [S]_n + K_T \cdot \beta_1 \cdot [S]_n \cdot [Cu]_n \cdot [N]_n.$$

Ces trois équations se transforment en trois fonctions F_1, F_2 et F_3 de $[N]_n$, $[Cu]_n$ et $[S]_n$ qui doivent être identiquement nulles :

— en soustrayant (31) de (30).

$$(32) \qquad F_1 = -[S]_n + ([N]_n)(1 + [H]/K_a) + \beta_1 \cdot [Cu]_n\,[N]_n + 2\,\beta_2 \cdot [Cu]_n \cdot [N]_n^2 - K_2\,[Cu]_n \cdot [S]_n - [N_0]_n + [S_0]$$

— en enlevant (29) de (30).

$$(33) \qquad F_2 = -[Cu]_n + ([N]_n)(1 + [H]/K_a) + \beta_2\,[Cu]_n \cdot [N]_n^2 - K_2 \cdot [Cu]_n \cdot [S]_n + [Cu_0] - [N_0]_n$$

(31) devient :

$$(34) \qquad F_3 = [S]_n + K_2\,[Cu]_n\,[S]_n + K_T \cdot \beta_1 \cdot [S]_n \cdot [Cu]_n \cdot [N]_n - [S_0]$$

Ce système d'équations non linéaires ne peut être résolu directement, il est nécessaire de le transformer en un système linéaire et de normaliser les inconnues de sorte que les données soient acceptées par la machine et rentrent dans ses possibilités de calcul.

La normalisation se fait facilement en multipliant les inconnues et les fonctions F_1, F_2 et F_3 par des coefficients constants judicieux.

En définitive, nous devons résoudre le système :

$$F_1(X_1, X_2, X_3) = 0$$
$$F_2(X_1, X_2, X_3) = 0$$
$$F_3(X_1, X_2, X_3) = 0.$$

Source : MNHN, Paris

Considérons une fonction $y = f(x)$, continue et monotone, dont on cherche la solution x_0 telle que $f(x_0) = 0$ (On peut montrer que F_1, F_2 et F_3 satisfont à ces conditions). Pour une valeur x_1 de x, on calcule la pente $y'_1 = f'(x_1)$, qui coupe l'axe des x en x_2; la pente $y'_2 = f'(x_2)$ conduit à une valeur x_3; en répétant l'opération, la série de valeurs $x_1, x_2, \ldots x_n$, si elle est convergente, tend vers une limite $f(x_n) \leqslant \eta$, où η est un infiniment petit (fig. 39).

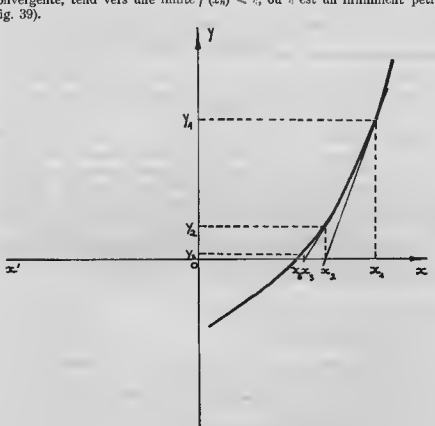


FIG. 39.

En appliquant cette méthode aux équations précédentes, on trouve une série convergente pour les X_j.

En appelant X_1^0, X_2^0 et X_3^0 les solutions du système F_1, F_2, F_3, et en posant :

$$dX_j = X_j^0 - X_j \tag{35}$$

il est possible d'écrire :

(36)

$$F_1(X_1^0, X_2^0, X_3^0) = F_1(X_1, X_2, X_3) + \frac{\delta F_1}{\delta X_1} \cdot dX_1 + \frac{\delta F_1}{\delta X_2} \cdot dX_2 + \frac{dF_1}{dX_3} \cdot dX_3$$

Source : MNHN, Paris

il en est de même pour F_2 et F_3.

En définitive, nous devons résoudre le système linéaire :

$$\sum_{j=1}^{3} \frac{\delta F_i}{\delta X_j} \cdot dX_j + F_i(X_1, X_2, X_3) = 0 \qquad (37)$$

Le processus d'itération exécuté par la machine sera le suivant : en se donnant des valeurs de départ X_1, X_2, X_3 approchées (qu'il est possible d'évaluer en résolvant le système où l'on suppose que le complexe ternaire est absent ($K_T \equiv 0$)), la machine calcule les fonctions $\frac{\delta F_i}{\delta X_j}$ et $F_i(X_1, X_2, X_3)$ pour ces valeurs; elle résout ensuite le système linéaire défini par l'équation (37) qui a pour inconnues les dX_j; elle calcule ensuite les valeurs $X_j + dX_j$ et recommence les opérations précédentes jusqu'à ce que $\left|\frac{dX_j}{X_j}\right| \leqslant \eta$; η est un infiniment petit qui définit la précision recherchée, nous l'avons fixé égal à 10^{-3}. La machine effectue généralement trois ou quatre itérations successives avant d'imprimer les valeurs de $[Cu]_n$, $[N]_n$ et $[S]_n$. Toutes les opérations menées selon ce principe ont conduit à des séries convergentes pour les X_j. Il n'en aurait pas été de même si, au lieu de poser la valeur de K_T, nous avions utilisé l'équation d'additivité (28) et fixé la valeur de ε_3. Certains termes déduits des expériences auraient présenté des valeurs négatives. La fonction $(\varepsilon_3)_n = f(K_2)$ qui sert de critère de validité à K_2 présente effectivement une dispersion minimale (cf. chapitre III).

BIBL. DU MUSEUM D'HIST. NATUR.

Source : MNHN, Paris

BIBLIOGRAPHIE

1. — R. Thomas. Biochim. biophys. Acta (1954), **14**, 231.
2. — L. F. Cavalieri, M. Rossoff, B. H. Rosenberg. J. amer. chem. Soc. (1956), **78**, 5239.
3. — L. F. Cavalieri, B. H. Rosenberg. J. amer. chem. Soc. (1957), **79**, 5352.
4. — L. Kgtin. J. mol. Biol. (1963), **7**, 309.
5. — J. W. Lyons, L. Kotin. J. amer. chem. Soc. (1965), **87**, 1670, et J. amer. chem. Soc. (1965), **87**, 1781.
6. — K. Fuwa, W. E. C. Wacker, R. Druyan, A. F. Bartholomay, B. L. Vallee. Proc. nation. Acad. Sci. U.S.A. (1960), **46**, 1298.
7. — G. L. Eichhorn. Nature (1962), **194**, 474.
8. — K. S. Kirby. Biochem. J. (1956), **64**, 405.
9. — H. S. Loring, R. S. Waritz. Science (1957), **125**, 646.
10. — W. E. C. Wacker, B. L. Vallee. J. biol. Chem. (1959), **234**, 3257.
11. — W. E. C. Wacker, M. P. Gordon, J. W. Huff. Biochemistry (1963), **2**, 716.
12. — L. A. Blumenfeld, A. E. Kalmanson, Sheng P'ei-Ken. Dokl. Akad. Nauk SSSR (1959), **124**, 1144.
13. — L. A. Blumenfeld, V. A. Benderskii. Dokl. Akad. Nauk SSSR (1960), **133**, 1451.
14. — M. S. Blois jr., J. E. Malino. Biochem. biophys. Res. Comm. (1961), **4**, 252.
15. — A. Muller, G. Hotz, K. G. Zimmer. Biochem. biophys. Res. Comm. (1961), **4**, 214.
16. — I. Isenberg. Biochem. biophys. Res. Comm. (1961), **5**, 139.
17. — H. G. Thon, C. Nicolau. Colloque Ampère, Leipzig, sept. 1961.
18. — L. A. Blumenfeld, V. A. Benderskii, A. E. Kalmanson. Biofizika (1961), **6**, 631.
19. — A. A. Alexandrov, V. Ju. Gavrilov, A. G. Kiselev, Ju. S. Lazurkin, M. A. Mokul'Skij. Dokl. Akad. Nauk SSSR (1961), **141**, 1483.
20. — W. M. Walsh jr., R. G. Shulman, R. D. Heidenreich. Nature (1961), **92**, 1041.
21. — M. Ptak, C. Ropars, P. Douzou. J. Chim. phys. (1962), **59**, 659.
22. — M. S. Blois jr., J. E. Maling, L. T. Taskovich. Biophys. J. (1963), **3**, 275.
23. — J. E. Maling, L. T. Taskovich, M. S. Blois jr. Biophys. J. (1963), **3**, 79.
24. — K. S. Kirby. Biochem. J. (1957), **66**, 495.
25. — L. F. Cavalieri. J. amer. chem. Soc. (1952), **74**, 1242.
26. — C. A. Dekker. Annu. Rev. Biochem. (1960), **29**, 453.
27. — B. Singer, H. Fraenkel-Conrat. Biochemistry (1962), **1**, 852.
28. — R. J. Wojnar, J. S. Roth. Biochim. biophys. Acta (1964), **87**, 17.
29. — H. S. Loring, S. Al-Rawi, Y. Fujimoto. J. biol. Chem. (1958), **233**, 1415.

Source : MNHN, Paris

30. — O. P. Samoilova, L. A. Blumenfeld. Biofizika (1961), **6**, 14.
31. — W. E. C. Wacker. Biochemistry (1962), **1**, 859.
32. — J. W. Huff, K. S. Sastry, M. P. Gordon, W. E. C. Wacker. Biochemistry (1964), **3**, 501.
33. — G. Zubay. Biochim. biophys. Acta (1959), **32**, 233.
34. — J. Shack, B. S. Bynum. Nature (1959), **184**, 635.
35. — J. W. Lyons, L. Kotin. J. amer. chem. Soc. (1964), **86**, 3634.
36. — S. Katz. J. amer. chem. Soc. (1952), **74**, 2238, et Nature (1962), **194**, 4569.
37. — T. Yamane, N. J. Davidson. J. amer. chem. Soc. (1961), **83**, 2599, et Biochim. biophys. Acta (1962), **55**, 780.
38. — S. Katz, V. Santilli. Biochim. biophys. Acta (1962), **55**, 621.
39. — Y. Kawade. Biochem. biophys. Res. Comm. (1963), **10**, 204.
40. — P. D. Ross, R. L. Scruggs. Biopolymers (1964), **2**, 79.
41. — M. Hanss. Thèse (1965), Paris.
42. — K. G. Stern, M. A. Steinberg. Biochim. biophys. Acta (1953), **11**, 553.
43. — G. L. Eichhorn, J. J. Butzow. Biopolymers (1965), **3**, 79.
44. — J. Eisinger, R. G. Shulman, W. E. Blumberg. Nature (1961), **192**, 963, et J. chem. Phys. (1962), **36**, 1721.
45. — W. M. Walsh jr., L. W. Rupp, B. J. Wyluda, dans : W. Low. Symposium on paramagnetic resonance (1963), **2**, 836. — Academic Press N.Y.
46. — W. Snipes, W. Gordy. J. chem. Phys. (1964), **41**, 3661.
47. — J. Eisinger, F. Fawatz-Estrup, R. G. Shulman. J. chem. Phys. (1965), **42**, 43.
48. — K. C. Banerjee, D. J. Perkins. Biochim. biophys. Acta (1962), **61**, 1.
49. — B. Singer. Biochim. biophys. Acta (1964), **80**, 137.
50. — G. L. Eichhorn, J. J. Butzow. Biopolymers (1965), **3**, 95.
51. — A. Abragham. Les principes du magnétisme nucléaire (1961); Presses Universitaires de France.
52. — R. Freymann, M. Soutif. La spectroscopie hertzienne appliquée à la chimie (1960); Dunod.
53. — D. J. E. Ingram. Spectroscopy at radio and microwave frequencies (1964). 2e Ed.; Butterworths.
54. — D. J. E. Ingram. Free radicals as studied by electron spin resonance (1958); Butterworths.
55. — W. Low. Paramagnetic resonance in solids (1960). Suppl. 2 de Solid State Physics; Academic Press.
56. — G. Pake. Paramagnetic resonance (1962); Benjamin Inc.
57. — Varian Associates. NMR and EPR spectroscopy (1960); Pergamon Press.
58. — G. Schoffa. Elektronspinresonanz in der Biologie (1964); Braun (Karlsruhe).
59. — M. S. Blois. Free radical in biological systems (1961); Academic Press.

Source - MNHN, Paris

60. — F. J. C. Rossotti, H. Rossotti. The determination of stability constants (1961); Mc. Graw-Hill Book.

61. — H. Rein, O. Ristau, F. Jung. Z. phys. Chem. Leipzig (1962), **221**, 197.

62. — B. O. A. Hedström. Ark. Kemi (1953), **6**, n° 1.

63. — G. Mattock. PH Measurement and titration (1961), p. 46; Heywood and Cy. LTD.

64. — L. N. Mulay, P. Selwood. J. amer. chem. Soc. (1955), **77**, 2693.

65. — P. Schindler, W. Michaelis, W. Feitknecht. Helv. chim. Acta (1963), **46**, 449.

66. — G. Biedermann, P. Schindler. Acta chem. scand. (1957), **11**, 731.

67. — H. Lenoweiller, W. Buser, W. Feitknecht. Helv. chim. Acta (1961), **44**, 796.

68. — K. H. Gayer, L. Woontner. J. phys. Chem. (1956), **60**, 1569.

69. — Buddhadev Sen. Anal. chim. Acta (1962), **27**, 515.

70. — R. D. Hurst. J. biol. Chem. (1953), **204**, 847.

71. — H. Galal-Gorchev, W. Stumm. J. inorg. nucl. Chem. (1963), **25**, 567.

72. — S. Fujiwara, H. Hayashi. J. chem. Phys. (1965), **43**, 23.

73. — E. Frieden, J. Alles. J. biol. Chem. (1958), **230**, 797.

74. — K. V. Giri, P. S. Rao. Proc. indian Acad. Sci., Sect. B (1945), **24**, 264.

75. — A. Albert. Biochem. J. (1953), **54**, 646.

76. — A. Albert, E. P. Serjeant. Biochem. J. (1960), **76**, 621.

77. — R. Weiss, H. Venner. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. (1963), **333**, 169.

78. — M. Cohn, T. R. Hughes jr. J. biol. Chem. (1962), **237**, 176.

79. — M. M. Taqui-Khan, A. E. Martell. J. amer. chem. Soc. (1962), **84**, 3037, et J. phys. Chem. (1962), **66**, 10.

80. — J. Eisinger, R. G. Shulman, B. M. Szymanski. J. chem. Phys. (1962), **36**, 1721.

81. — G. Zubay, P. Doty. Biochim. biophys. Acta (1958), **29**, 47.

82. — D. Voet, W. B. Gratzer, R. A. Cox, P. Doty. Biopolymers (1963), **1**, 193.

83. — E. B. Sandell. Colorimetric determination of traces of metals (1959); Interscience Publishers.

84. — B. et A. Pullman. Quantum biochemistry (1963), p. 253-258; Interscience Publishers.

85. — A. E. Martell, M. Calvin. Chemistry of metal chelate compounds (1956), p. 403; Prentice Hall Inc.

86. — M. Cohn, J. S. Leigh. Nature (1962), **193**, 1037.

87. — K. W. Kohn. Nature (1961), **191**, 1156.

88. — E. Chargaff, J. N. Davidson. The nucleic acids (1955), I, p. 447; Academic Press Inc.

89. — C. Ropars, R. Viovy. C. R. Acad. Sci. (1963), **257**, 3499.

90. — C. Ropars, R. Viovy. C. R. Acad. Sci. (1964), **258**, 731.

Source : MNHN, Paris

91. — C. Ropars, R. Viovy. J. Chim. phys. (1965), **62**, 408.

92. — G. L. Eichhorn, P. Clark. Proc. nation. Acad. Sci. U.S.A. (1965), **53**, 586.

93. — S. Hiai. J. mol. Biol. (1965), **11**, 672.

94. — J. H. Coates, D. O. Jordan, V. K. Srivastava. Biochem. biophys. Res. Comm. (1965), **20**, 611.

95. — J. Bjerrum. Chem. Rev. (1950), **46**, 381.

96. — D. D. Perrin. J. chem. Soc. (1958), 3125.

97. — R. A. Stukan, A. N. Il'Ina, Yu. Moshkovskii, V. I. Goldanskii. Biofizica (1965), **10**, 343.

98. — J. M. Sturtevant, S. A. Rice, E. P. Geiduscheck. Disc. Faraday Soc. (1958), n° **25**, 138.

DU MUSEUM D'HIST. NATUR.

Source : MNHN, Paris

Achevé d'imprimer le 1er avril 1966.

Printed in France — *Le Directeur-Gérant :* Prof. CHABAUD

59361. — Imp. LAHURE, 9 rue de Fleurus, Paris (6e).
Dépôt légal : 1er trimestre 1966.

Source : MNHN, Paris

Source : MNHN, Paris

Source : MNHN, Paris

Source : MNHN, Paris

Source : MNHN, Paris

Les Mémoires du Muséum National d'Histoire naturelle paraissent sans périodicité fixe. Chaque volume est formé d'un nombre variable de fascicules, publiés isolément et ne contenant qu'un seul mémoire.

Les auteurs reçoivent 50 tirages à part de leurs travaux, brochés et sous couverture. Ils s'engagent à ne pas les mettre dans le commerce.

Les fascicules sont en vente aux *Editions du Muséum National d'Histoire naturelle*, 38, rue Geoffroy-Saint-Hilaire, Paris (5e).

Compte chèque postal : PARIS 9062-62.

ÉDITIONS DU MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

38, rue Geoffroy-Saint-Hilaire, Paris

Archives du Muséum National d'Histoire naturelle (commencées en 1802 comme *Annales du Muséum National d'Histoire naturelle*). Un volume in-4° par an.

Bulletin du Muséum National d'Histoire naturelle (commencé en 1895). Un volume in-8° par an.

Mémoires du Muséum National d'Histoire naturelle, nouvelle série (commencés en 1936). In-8°, sans périodicité fixe.

Publications du Muséum National d'Histoire naturelle (sans périodicité fixe). Paraît par fascicules in-8°.

Revue française d'Entomologie (Directeur : Dr R. Jeannel, laboratoire d'Entomologie). Paraît depuis 1934. In-8°.

Adansonia (commencées en 1999 comme *Notulae systematicae*). (Directeurs : MM. H. Humbert et A. Aubréville, laboratoire de Phanérogamie). In-8°, sans périodicité fixe.

Index seminum in Hortis Musei parisiensis collectorum (Service de Culture). Paraît depuis 1822. Echange.

Journal d'Agriculture tropicale et de Botanique appliquée. (Secrétaires : MM. J.-F. Leroy et J. Carayon). Paraît depuis 1954.

Revue Algologique (Directeurs . MM. R. Lami et P. Bourrelly, laboratoire de Cryptogamie). Paraît depuis 1924; in-8°.

Revue Bryologique et Lichénologique (Directeur : Mme Allorge, laboratoire de Cryptogamie). Paraît depuis 1874; in-8°.

Revue de Mycologie, anciennement *Annales de Cryptogamie exotique* (Directeur : M. R. Heim). Paraît depuis 1928; in-8°.

Mammalia (Directeur : M. J. Dorst, laboratoire de Mammologie). Paraît depuis 1936; in-8°.

Bulletin du Laboratoire maritime du Muséum National d'Histoire naturelle, à Dinard (Directeur : M. R. Heim, laboratoire maritime de Dinard). Paraît depuis 1928; in-8°.

Travaux du Laboratoire de « La Jaysinia » (Directeur : M. H. Humbert, laboratoire de Phanérogamie). Paraît par fascicules in-8°.

ource : MNHN Paris